

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

Nathan Ryzewski Strogulski

Decanoato de nandrolona e AMPK modulam a macroautofagia e bioenergética cerebral no envelhecimento

Porto Alegre

2018

Nathan Ryzewski Strogulski

**Decanoato de nandrolona e AMPK modulam a macroautofagia e
bioenergética cerebral no envelhecimento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Strogulski, Nathan Ryzewski
Decanoato de nandrolona e AMPK modulam a
macroautofagia e bioenergética cerebral no
envelhecimento / Nathan Ryzewski Strogulski. -- 2018.
76 f.
Orientador: Luis Valmor Cruz Portela.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Autofagia. 2. Envelhecimento. 3. Esteroides
Anabólicos Androgênicos. I. Portela, Luis Valmor
Cruz, orient. II. Título.

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

“The man who comes back through the Door in the Wall will never be quite the same as the man who went out. He will be wiser but less sure, happier but less self-satisfied, humbler in acknowledging his ignorance yet better equipped to understand the relationship of words to things, of systematic reasoning to the unfathomable mystery which it tries, forever vainly, to comprehend.”

— Aldous Huxley, *The Doors of Perception*

Agradecimentos

A frase “A ciência é uma arte colaborativa” não poderia ser melhor empregada do que neste espaço, onde gostaria de dedicar poucas, mas sinceras palavras de agradecimento àqueles que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Vera e Luis e ao meu irmão Theo, o amor e apoio incondicional certamente foram o que me motivou e sustentou na caminhada até aqui, e a vocês devo tudo. Aos meus padrinhos Flávia e Fernando, e aos meus primos Mathias e Pedro, e finalmente à minha tia Roselaine cuja a convivência, conselhos e suporte foram indispensáveis. À minha namorada Radha, que me acompanhou por um bom trajeto do caminho e cuja companhia fez os momentos de descanso serem infinitamente mais agradáveis. A todos os técnicos administrativos, bolsistas e colaboradores, que sempre fizeram o seu melhor para que todas as etapas do mestrado discorressem de maneira adequada e sempre mais que disponíveis para ajudar nos momentos necessários. Finalmente, gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, orientandas da professora Lisiane, Daniela M, Amandinha e Catiane, pela paciência com o barulho e a bagunça.

Sinceramente acredito que no Lab Neurotrauma a ciência é uma arte, e ela é colaborativa. Aos guris Afonso, Marcelo, Randhall e às gurias Mônia e Marcelli agradecimentos por toda ajuda, apoio e amizade. Ao Professor Roska, o meu mais sincero obrigado por toda paciência e suporte desde a idealização do projeto até as linhas finais deste trabalho.

Índice:

Capítulo I.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Lista de Abreviaturas.....	4
1. Introdução.....	5
1.1 O envelhecimento.....	5
1.1.1 O Envelhecimento populacional.....	5
1.1.2 As Características Biológicas do Envelhecimento.....	7
1.2 A Autofagia.....	9
1.2.1 A Autofagia no Envelhecimento.....	9
1.2.2 A Sinalização da Autofagia no Envelhecimento.....	10
1.2.3 Envelhecimento e homeostase energética.....	14
1.3 Terapia para Reposição de Testosterona.....	15
Capítulo II.....	19
Capítulo III.....	51
Discussão.....	52
Resumo Gráfico.....	58
Conclusão.....	59
Referências.....	60

Capítulo I

Resumo

Sabe-se que alterações na homeostase energética e proteica ao longo do envelhecimento, estão associadas com doenças neurodegenerativas. Fisiologicamente, a mitocôndria funciona como uma organela integradora do metabolismo energético oxidativo influenciando o sistema de depuração de proteínas desnoveladas e organelas disfuncionais, autofagia. O envelhecimento pode levar à ruptura funcional destes sistemas resultando em prejuízos neuroenergéticos e acúmulo de proteínas tóxicas. Neste sentido, o declínio nos níveis de testosterona, um hormônio anabólico, tem sido proposto como um potencializador do declínio das funções fisiológicas no envelhecimento. O objetivo deste estudo foi investigar se a suplementação com decanoato de nandrolona (ND), um derivado sintético da testosterona, em animais envelhecidos melhora o metabolismo energético mitocondrial e mecanismos autofágicos. Camundongos machos albino CF1 de 3 e 18 meses foram submetidos à análise basal de captação de fluorodesoxiglicose (^{18}FDG) através de tomografia por emissão de pósitrons (microPET-FDG). Posteriormente eles foram alocados em 4 grupos que receberam uma injeção diária subcutânea de ND (15mg/kg; Grupos 3 m/ND e 18 m/ND) ou veículo oleoso (VEH) (Grupos 3 m/VEH; 18 m/VEH), durante 15 dias. Os animais foram resubmetidos à análise de microPET-FDG, e logo após a eutanásia foi realizada a respirometria de alta resolução, para avaliação funcional dos estados de respiração mitocondrial em preparações de sinaptossomas. Para tanto, utilizamos um protocolo com substratos energéticos, um desacoplador e inibidores do sistema de transporte de elétrons. Ainda, os imunociteados hipotalâmicos de AMPK e pAMPK^{T172}, bem como de LC3 foram avaliados como biomarcadores de homeostase energética e de fluxo autofágico, respectivamente. Os resultados demonstram que os camundongos envelhecidos não apresentaram alterações significativas na captação cerebral de ^{18}FDG e nos estados de respiração mitocondrial. Também, os animais envelhecidos apresentaram menor razão pAMPK^{T172}/AMPK, Beclin-1, BCL-2 e LC3II/LC3I em relação aos animais jovens controle. A suplementação de ND nos animais jovens aumentou a captação de ^{18}FDG e o consumo de oxigênio no estado routine sem influenciar os outros estados mitocondriais. A ND nos animais envelhecidos não aumentou a captação de ^{18}FDG , e nem o consumo de oxigênio nos estados mitocondriais. Nos animais envelhecidos a ND aumentou a razão pAMPK^{T172}/AMPK e LC3II/LC3I, bem como a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial. Observamos que este mecanismo não se dá por modulação de Beclin-1. Nossos resultados sugerem que envelhecimento não culmina necessariamente em modificações funcionais da capacidade energética cerebral, embora os biomarcadores moleculares de estado energético e fluxo autofágico estejam diminuídos. A ND melhorou a eficiência bioenergética mitocondrial e o fluxo autofágico sem aumentar a captação de ^{18}FDG . Estes benefícios são provavelmente mediados pela reprogramação da sinalização via AMPK.

Palavras-chave: Envelhecimento, Bioenergética mitocondrial, Autofagia, Decanoato de Nandrolona

Abstract

Physiologically, the mitochondria integrates oxidative metabolism and cellular mechanisms responsible for turnover of dysfunctional organelles and proteins namely autophagy. Conversely, aging disrupt this functional interplay, leading to neuroenergetic deficits coupled with protein aggregation. In this sense, the decay in testosterone levels, an anabolic hormone, has been proposed as a trigger to accelerate functional decline during ageing. Thus, in this study we investigated whether nandrolone decanoate (ND) supplementation, a synthetic analog of testosterone, in aged animals influences mitochondrial respiratory complex activity along with autophagic flux. Albino CF1 mice of 3 (3m) and 18 (18m) months of age were submitted to baseline fluorodeoxyglucose (^{18}FDG) uptake analysis, through positron emission tomography scans (microPET-FDG). They were separated in 4 groups that received daily subcutaneous injections for 15 days of either ND (15mg/kg) (Groups 3m/ND; 18m/ND), or equivalent volume of vehicle (Groups 3m/VEH; 18m/VEH). Mice were resubmitted to microPET-FDG analysis and euthanised. High resolution respirometry was performed to assess mitochondrial respiratory states function and respiratory control ratio (RCR) in synaptosomes of entire left hemisphere. For such, a protocol of substrates, uncouplers and inhibitors of electron transport system were sequentially titrated. Also, hypothalamic immunoccontent of AMPK e pAMPK^{T172}, as well as LC3, were assessed as biomarkers, proxy of homeostatic energy balance and autophagic flux, respectively. Results demonstrate that aged animals do not display significant alterations nor in brain ^{18}FDG uptake, neither in mitochondrial respiratory states Routine, Leak, Oxphos and Uncoupled. Also, aged animals displayed reduced pAMPK^{T172}/AMPK ratio, and increased LC3-II compared to adult controls. ND supplementation in adults increased cerebral ^{18}FDG uptake, as well as increased Routine mitochondrial oxygen consumption rate (OCR). Curiously, ND supplementation in aged animals did neither lead to ^{18}FDG uptake, nor alterations in mitochondrial states OCR. In aged animals ND treatment caused an increased pAMPK^{T172}/AMPK ratio, LC3-II turnover, as well as increased mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency, as evidenced by increased RCR. ND supplementation does not incur in significant alterations of Beclin-1/BCL-2 immunoccontents. Our results suggest that aging does not culminate necessarily in functional alterations in mitochondrial capacity to produce ATP, although molecular biomarkers of energetic status and autophagic flux are reduced. ND improved mitochondrial ATP synthesis and LC3-II turnover in aged mice without increasing ^{18}FDG uptake. These benefits are probably mediated by reprogramming of AMPK signalling.

Key-words: Ageing, Mitochondrial Bioenergetics, Autophagy, Nandrolone Decanoate.

LISTA DE ABREVIATURAS:

AMPK - Proteína cinase ativada por 5'-AMPK

FDG - 2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucose, fluorodesoxiglicose

LC3 – Do inglês “*Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*”

mTOR – do inglês “Mechanistic Target of Rapamicin

ND – Decanoato de Nandrolona

OCR – Do inglês “Oxygen Consumption Rate”, taxa de consumo de oxigênio

PAS – Do inglês “Phagophore Assembly Site”, sítio de montagem do fagoforo

PET – Tomografia por emissão de Pósitrons

RCR – Controle respiratório

TRT – Terapia de reposição de testosterona

VEH – Veículo de diluição

1. INTRODUÇÃO:

1.1 O Envelhecimento

1.1.1 O Envelhecimento populacional

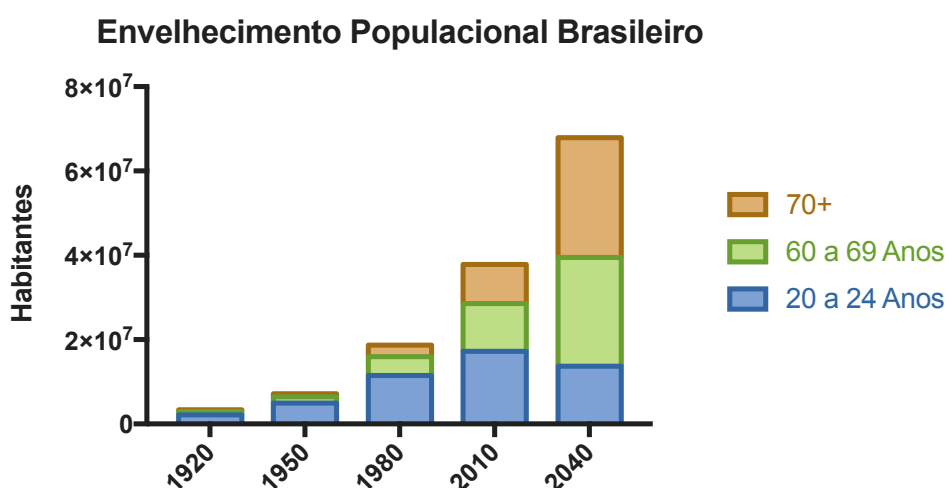
Relevantes avanços no conhecimento e prática médica, bem como no arsenal farmacoterapêutico voltado a doenças infectocontagiosas permitiram um aumento drástico na expectativa de vida da população mundial. A Organização Mundial da Saúde (WHO) afirma que o envelhecimento da população é um dos maiores triunfos da humanidade, mas ao mesmo tempo um dos maiores desafios (WHO, 2002).

Tais avanços guiaram alterações no perfil demográfico, de forma que, estudos anteriores indicam um aumento de três vezes no percentual correspondente à população norte-americana com mais de 65 anos, dos anos 1900 a 2000, com estimativas de que até o ano de 2030 este valor seja quintuplicado. Em países europeus como Alemanha e Itália, a população de sexagenários já corresponde a 20 % da população. Esta alteração no perfil demográfico não se restringe a países ocidentais ou desenvolvidos, visto que se estima a duplicação na população de sexagenários da América Latina no período de 2000 a 2030 (FERRUCCI; GIALLAURIA; GURALNIK, 2008).

No Brasil, o envelhecimento populacional, ao contrário de outros países, ocorreu de forma rápida e abrupta, com a população acima de 60 anos crescendo em mais de dez vezes no período de 1920 a 2010, conforme exposto na **figura 1**. Esta alteração abrupta na demografia da população se reflete numa necessidade de qualificar o serviço médico e políticas de saúde,

gerando um fardo econômico para o sistema de saúde, o qual foi avaliado em mais de 33 bilhões de reais de 1998 a 2013 (MORAIS et al., 2016).

Fig.1



Adaptado de: Morais et. al. 2016

Evidentemente, observada a crescente demanda populacional, a indústria farmacêutica investe fortemente no estudo de terapias “anti-envelhecimento”, movimentando um mercado multimilionário nos últimos 20 anos. Estas empresas representam um grande baluarte indicador do pesado investimento em pesquisa visando múltiplas farmacoterapias para doenças relacionadas ao envelhecimento (DREs) e estratégias de prevenção das alterações que aceleram os mecanismos de envelhecimento celular (DE MAGALHÃES; STEVENS; THORNTON, 2017).

Desta forma, vista a alta relevância econômica, social e científica do envelhecimento, conclui-se a imprescindibilidade da melhor compreensão de

seus mecanismos biológicos fundamentais, para que se possa promover novas alternativas terapêuticas endereçadas a alvos celulares específicos.

1.1.2 As Características Biológicas Do Envelhecimento:

Biologicamente, o envelhecimento pode ser caracterizado por nove alterações chave nas funções fisiológicas, relacionados ao declínio geral de funções celulares, de forma tempo-dependente, sendo estas: perda da homeostase energética, deposição intra e extracelular de proteínas desenoveladas, acúmulo de organelas disfuncionais, alterações epigenéticas, encurtamento de telômeros, instabilidade genômica, comunicação intercelular alterada, exaustão das células tronco e senescência celular (LOPEZ-OTIN et al., 2013).

Impulsionado pelo acúmulo de mutações, encurtamento telomérico ou exaustão de células tronco, o envelhecimento decorre de danos que quando acumulados, superam a capacidade adaptativa normal da célula, portanto, fatores genéticos e principalmente ambientais como poluição e dietas não saudáveis, influenciam no envelhecimento (MOSKALEV et al., 2013). De forma geral, a integridade do DNA é desafiada por três mecanismos distintos: reações espontâneas, como hidrólise, as quais são consequência intrínseca da estrutura química das bases nucleicas que estão em meio aquoso (LINDAHL, 1993); reações causadas por agentes endogenamente produzidos pelo próprio organismo, sendo eles por exemplo, espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, produtos de peroxidação lipídica, os quais podem causar danos oxidativos às moléculas de DNA (DE BONT; VAN LAREBEKE, 2004); e reações causadas por agentes químicos e físicos externos que atuam como

agentes mutagênicos, como poluição do ar e radiação ultravioleta (DRIGEARD DESGARNIER; ROCHETTE, 2018; MØLLER et al., 2014).

Até a presente data não foram descritos mecanismos de reciclagem de moléculas danificadas de DNA, o que significa que diferente de outras biomoléculas, ela depende exclusivamente de mecanismos reparativos, o que permite a perpetuação e acúmulo progressivo de alterações em sua estrutura, especialmente quando se leva em consideração a contínua exposição a danos endógenos e exógenos (HOEIJMAKERS, 2009).

É importante ressaltar, entretanto, que as alterações-chave do envelhecimento postuladas por Lopes-Otin *et al* (LOPEZ-OTIN et al., 2013) nem sempre estão associadas a eventos patológicos. Elas fazem, de fato, parte do processo fisiológico de envelhecimento saudável; entretanto sua exacerbação pode acarretar em doenças, como por exemplo o acúmulo exacerbado de organelas disfuncionais e de agregados proteicos que se tornam tóxicos e contribuem para a patofisiologia de doenças neurodegenerativas.

1.2. A Autofagia

1.2.1 A Autofagia no envelhecimento

De fato, múltiplas doenças neurodegenerativas têm como cerne mecanístico uma proteinopatia de deposição, isto é, o acúmulo de proteínas (ou de uma proteína chave) disfuncionais, dentre as quais pode-se rapidamente citar doenças como Alzheimer, Huntington, e Esclerose Amiotrófica Lateral (Proteína Tau e Peptídeo Beta Amilóide; Huntingtina; SOD-

1 e TDP-43, respectivamente) (CASTILLO et al., 2013; SARKAR et al., 2009; ZEROVNIK, 2010).

Frente à citotoxicidade causada pela deposição descontrolada de agregados proteotóxicos, a célula dispõe de um mecanismo adaptativo, evolutivamente conservado, de degradação chamado autofagia. A autofagia responde a um amplo escopo de sinalizações intracelulares, que envolvem desde a deprivação de nutrientes e energia (DONG et al., 2015), o acúmulo de agregados proteicos, e finalmente, sinalização hormonal (SERRA et al., 2013).

Há uma relação inversa consistente entre envelhecimento e a autofagia, *in vivo*, em diversos tecidos (SALMINEN; KAARNIRANTA; KAUPPINEN, 2013; TAYLOR; DILLIN, 2011; TERMAN, 1998). Sabe-se que melhoras na sinalização e maquinaria autofágica levam a aumentos no tempo de vida em diversos modelos experimentais (KENYON, 2005; SALMINEN; KAARNIRANTA, 2012; STAMBLER, 2014; YANG et al., 2014), bem como que a modulação dos componentes moleculares do processo autofágicos representam potencial terapêutico em modelos de DREs.

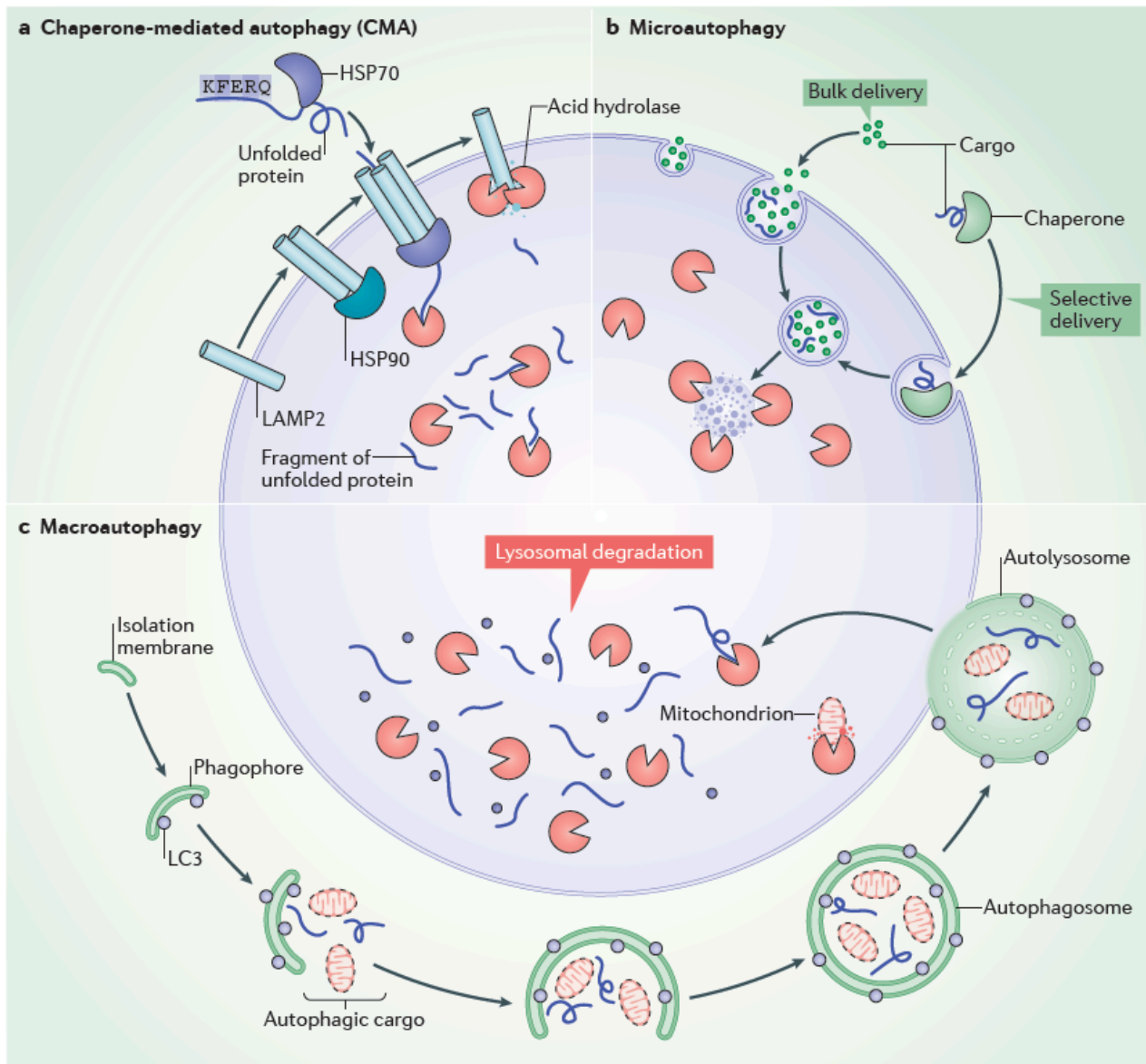
1.2.2 A Sinalização da Autofagia no Envelhecimento

A autofagia corresponde a um grupo de processos intracelulares (Fig.2), que, de forma geral, envolvem o endereçamento, seletivo ou não, de conteúdo celular que tem como destino final a degradação lisossomal (GALLUZZI et al., 2016). Ela pode ser classificada quanto à forma de endereçamento ao lisossomo, a qual pode ocorrer pela invaginação da membrana lisossomal, no que é denominado microautofagia (ROBERTS et al., 2003), ou pelo

endereçamento direto ao lisossomo por proteínas chaperonas, denominado autofagia mediada por chaperona (MORLEY; MORIMOTO, 2004).

O processo mais amplamente descrito é conhecido como macroautofagia, que será referido genericamente neste trabalho como autofagia. A macroautofagia depende da formação de uma vesícula de membrana dupla, denominada autofagossoma, a qual engulfa material citoplasmático a ser degradado, posteriormente se fundindo com o lisossoma e formando o autolisossoma. Tal mecanismo permite processamentos de compostos com grandes volumes, como agregados proteicos. Apesar de denotar baixa seletividade, a macroautofagia possui mecanismos que permitem realizar, quando necessário, a reciclagem seletiva de organelas disfuncionais, como por exemplo mitocôndrias ou peroxissomas (YORIMITSU; KLIONSKY, 2005).

Fig. 2 Classificações gerais da autofagia



Fonte: Galluzzi et al., 2016

Por fazer parte central nos mecanismos de reciclagem de conteúdo intracelular, o fluxo autofágico, que compreende a indução, maturação e degradação de autofagossomas, ocorre fisiologicamente inclusive em níveis basais e um desequilíbrio nesse funcionamento pode desencadear em perda da homeostase proteica, conduzindo no cérebro à neurodegeneração (GALLUZZI et al., 2015; KOMATSU et al., 2006).

A regulação da autofagia foi extensamente descrita em leveduras, onde depende da interação orquestrada de proteínas que foram agrupadas como proteínas da família ATG. Esta família de proteínas sustenta as etapas responsáveis pela formação e maturação do autofagossoma. A iniciação da autofagia se dá pela formação do fagóforo, a qual é mecanisticamente guiada pela formação de um supercomplexo de proteínas ATG denominado PAS (do inglês: *Phagophore Assembly Site*), o sítio de montagem do fagóforo, no qual se reúnem 6 classes de proteínas ATG que cooperam para a construção do autofagossomo (NODA; INAGAKI, 2015; SUZUKI et al., 2001).

As proteínas ULK1 e ULK2, são serina/treonina cinases, que são os ortólogos da proteína ATG1 descrita em leveduras. Ambas ULK1/ULK2, são responsáveis pela formação de um complexo proteico composto por mATG13, RB1CC1, e ATG101, o qual é responsável pela iniciação do PAS. Curiosamente, o mecanismo de serina/treonina cinase não é essencial para a formação do PAS, mas sim para a regulação por fosforilação dos complexos proteicos subsequentes da via de formação do fagóforo induzida por ULK1/ULK2. A formação do complexo proteico de ULK1 então mobiliza as proteínas ATG9 e do complexo PI3K, possibilitando o início da formação do fagóforo. Esta etapa é um dos pontos de regulação da autofagia (MIZUSHIMA, 2010). A via de regulação da autofagia PI3K/AKT/mTOR tem como mecanismo regulador a fosforilação de mAtg13, impedindo a formação do PAS e a iniciação do fagóforo (GANLEY et al., 2009).

A Proteína mTOR (do inglês: *mechanistic Target of Rapamycin*) é uma proteína cinase que desempenha um papel central na regulação do metabolismo de aminoácidos, e possui alvos na regulação traducional e pós-

tradicionais do fluxo autofágico. Por exemplo, além de fosforilar mATG13, ela também é responsável por inibir a tradução de proteínas da maquinaria autofágica através da translocação do fator de transcrição TFEB para o núcleo (MEDINA et al., 2015; ROCZNIAK-FERGUSON et al., 2012). mTOR também regula a autofagia através da fosforilação de ULK-1 no resíduo de serina 757, inibindo a formação do PAS. Na presença de aminoácidos, mTOR desencadeia um sinal inibitório da autofagia (KIM et al., 2011), o que, ao invés de degradação, favorece a síntese de proteínas. De maneira geral, pode se dizer que o aumento da funcionalidade de mTOR e seus alvos mecânicos estão intimamente relacionada ao envelhecimento embora as consequências desta ativação para a regulação da homeostase energética global e da autofagia ainda necessitem ser melhor elucidadas (DERETIC, 2005; GOLDBERG et al., 2018; HUANG; FINGAR, 2014; JOHNSON; RABINOVITCH; KAEBERLEIN, 2013; UM et al., 2004; WEICHHART, 2018; YANG et al., 2012).

Apesar do seu papel na regulação do recrutamento do PAS e fosforilação de Atg13 e ULK1, é possível regular a autofagia de forma mTOR-independente. Dentre estes mecanismos se destacam os da proteína Beclin-1 e AMPK. A proteína Beclin faz parte de uma plataforma molecular com capacidade de, através da interação com uma série de proteínas, regular processos autofágicos, de fagocitose e formação de vacúolos intracelulares (KANG et al., 2011; KONISHI et al., 2012; SALMINEN; KAARNIRANTA; KAUPPINEN, 2013). Em especial, sua interação com proteínas BCL-2 é essencial para seu papel regulador da autofagia e apoptose. Esta direta interação de BCL-2 com Beclin-1 é responsável pela inibição dos mecanismos

de iniciação da autofagia desempenhados pela Beclin-1 (PATTINGRE et al., 2005). Por outro lado, um dos mecanismos amplamente descritos da indução de autofagia decorre da fosforilação de ULK-1, em sítios distintos aos alvos de mTOR, por uma proteína central ao sistema de regulação energética, a proteína cinase regulada por AMP, AMPK. Brevemente, o mecanismo envolve a fosforilação direta de ULK-1 nas serinas 317 e 777, as quais regulam positivamente a ULK-1 iniciando o processo de formação do autofagossomo (KIM et al., 2011).

1.2.3 Envelhecimento e homeostase energética

A proteína AMPK já foi descrita como central na regulação da homeostase celular, tendo papel ainda mais relevante no hipotálamo, região cerebral responsável pela manutenção da homeostase energética sistêmica (LÓPEZ et al., 2016). Cabe salientar que, durante o envelhecimento, propõe-se que ocorre um desequilíbrio na regulação do metabolismo anabólico em favor do catabólico. Apesar do catabolismo global ser favorecido, o cérebro de idosos saudáveis aparentemente demonstra características de hipometabolismo. No entanto é necessário levar em conta que o metabolismo é integrado e na maioria das vezes os estudos abordam o metabolismo levando em perspectiva apenas um substrato ou via metabólica (BRENDDEL et al., 2017; GJEDDE, 1987; KAKIMOTO et al., 2016). A sinalização da baixa disponibilidade de substratos energéticos se dá por via da fosforilação da AMPK α na treonina 172, realizada pela proteína LKB1. O fator desencadeante da ação da LKB1 sobre AMPK α é o aumento dos níveis de AMP, associado a uma redução na relação ATP/ADP. A regulação de AMPK pode ser mediada

pela ação da proteína cinase dependente de Cálcio-calmodulina cinase 2 (CAMKK2) (CARLING et al., 2011; WOODS et al., 2003, 2005). As evidências que apontam um déficit de na homeostase energética com o envelhecimento são controversas e têm sido assunto de intenso debate. Um artigo recentemente publicado por Holloway et al. 2018, mostra que a atividade ATP sintase mitocondrial (Complexo V) em biópsias de músculo esquelético humano apresenta uma insensibilidade ao ADP induzida pelo envelhecimento. Baseado nisso os autores propõem que a detecção de deficiências bioenergéticas no envelhecimento teriam sido provavelmente afetadas por concentrações não ideais de ADP (HOLLOWAY et al., 2018).

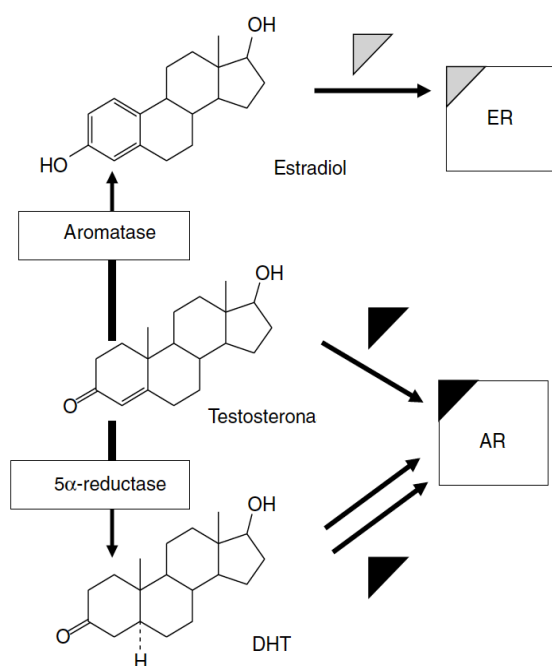
Além da AMPK sofrer regulação por disponibilidade de substratos, ela pode ser regulada por sinais hormonais, como da testosterona, um hormônio anabólico androgênico endogenamente produzido (WHITE et al., 2013a).

1.3 Terapia para Reposição de Testosterona:

A testosterona é sintetizada endogenamente a partir do colesterol. Ela e seus análogos sintéticos podem sofrer biotransformações por 2 principais enzimas: 5- α -redutase e aromatase. A ação da 5- α -redutase gera compostos com afinidade ao receptor androgênico. No caso da testosterona, a ação da 5- α -redutase gera a dihidrotestosterona, um metabólito com afinidade ao receptor androgênico maior que da própria testosterona. Já a ação da enzima aromatase gera compostos com afinidade ao receptor estrogênico, no caso da testosterona o estradiol (CLARK; HENDERSON, 2003; KICMAN, 2008) (figura 3). Ativação do receptor androgênico desencadeia dois tipos distintos de alterações. A via clássica envolve a ativação do receptor androgênico pelo seu

ligante e formação um homodímero, que interage com elementos de resposta no DNA. Esta interação promove a transcrição de proteínas que exercem efeitos tróficos (HEINLEIN; CHANG, 2002). Ocorre também uma resposta não clássica, que envolve ação de segundos mensageiros e ocorre de maneira mais rápida (ESTRADA et al., 2003; VALVERDE; PARKER, 2002).

Figura 3.

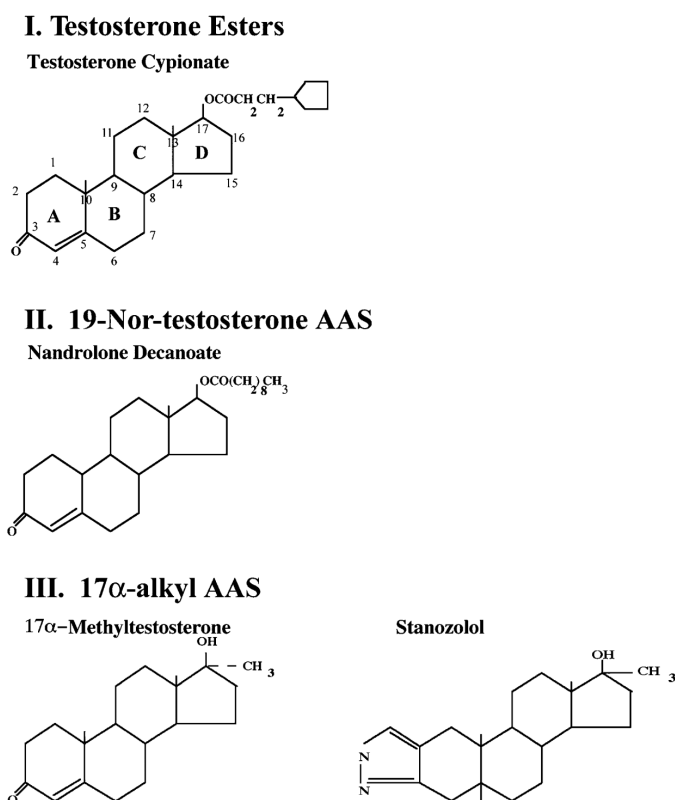


Adaptado de: **Kicman, 2008**

Do ponto de vista farmacológico, os análogos sintéticos de testosterona ou esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) podem ser agrupados em 3 grupos distintos, de acordo com suas estruturas químicas, características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. A Classe 1 de EAAs são os chamados ésteres de testosterona, que possuem como característica química a esterificação do oxigênio β -17-hidroxil. Tal estrutura confere a estes compostos

baixa biodisponibilidade oral, de forma que são administrados de forma injetável. Os EAAs classe 2 são conhecidos como derivados de 19-nor-testosterona, dentre eles está, o decanoato de nandrolona (ND) que possui maior efeito anabólico em relação a testosterona. Estes compostos, além da cadeia lateral esterificada no carbono 17, têm na sua estrutura a substituição do carbono 19 por um hidrogênio, o que confere maior tempo de meia vida. Assim como os compostos classe 1, podem ser transformados em agonistas estrogênicos, entretanto, a nandrolona apresenta menor afinidade com a enzima aromatase comparado à testosterona (RYAN, 1959). Finalmente, os compostos de classe 3, possuem adicionalmente alquilação no carbono 17, o que retarda metabolismo hepático, reduzindo efeito de primeira passagem e possibilitando o uso oral. (Figura 4) (CLARK; HENDERSON, 2003)

Figura 4:



Adaptado de: Clark; Henderson 2003.

Simultaneamente à redução na funcionalidade dos processos metabólicos no envelhecimento ocorre, particularmente em homens, uma redução nos níveis séricos de testosterona (MITCHELL et al., 1995). Este hormônio androgênico tem a capacidade de induzir um aumento no metabolismo anabólico (e.g. controle da síntese e degradação de proteínas), o que é clinicamente relevante em pacientes que apresentam exacerbação do metabolismo catabólico como HIV/SIDA, e cânceres (JASUJA et al., 2018). Embora o envelhecimento não seja uma doença, é importante ressaltar uma tendência ao estado catabólico no envelhecimento. No entanto como foi dito anteriormente fatores genéticos e ambientais, como dieta e sedentarismo, devem ser levados em conta. Assim, a aplicabilidade do uso de testosterona e seus análogos para fins de melhora funcional no envelhecimento é tópico de estudo desde o século 19 (BROWN-SÉQUARD, 1899), indicando que ela melhora a força e metabolismo muscular, o bem estar geral, a disposição para realizar tarefas, a libido e as capacidades cognitivas (JANOWSKY; OVIATT; ORWOLL, 1994). Embora estas evidências sinalizam efeitos positivos no sistema nervoso central, os mecanismos envolvidos no que diz respeito à sinalização autofágica e bioenergética mitocondrial ainda são pouco elucidados.

Desta forma, o objetivo primário desta dissertação foi investigar se a suplementação com decanoato de nandrolona influencia a interação entre captação glicose, atividade dos complexos respiratórios mitocondriais e mecanismos autofágicos no cérebro de camundongos envelhecidos.

Artigo a ser submetido para o periódico Aging Cell.

Capítulo II

Nandrolone Decanoate supplementation improves mitochondrial bioenergetics, AMPK activation and autophagic flux in aged mice.

Authors: Strogulski, N.S¹; Kopczinski, A¹; Carteri, R.B¹; Sartor, M¹; Hansel, G²; Venturin, G.T³; Greggio, S³; da Costa, J.C³; Rodolphi, M.S¹; Portela, L.V¹.

¹ Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Penn Center for Brain Injury and Repair and Department of Neurosurgery, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104

³ Brain Institute of Rio Grande do Sul (Brains), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

The mitochondria is a hub of oxidative metabolism, influencing autophagic flux. Aging can lead to a functional disruption of these systems, leading to neuroenergetic and proteotoxic imbalance. Lower levels of testosterone has been proposed as a mechanism accelerating functional decline during aging. In this study we investigated whether nandrolone decanoate (ND), an analog of testosterone, in aged animals influences mitochondrial respiratory complex activity along with autophagic flux. Albino CF1 mice of 3 and 18 months of age, were separated in 4 groups that received daily subcutaneous injections for 15 days of either ND (15mg/kg), or vehicle. Were performed baseline and 14th day ¹⁸FDG uptake analysis, through positron emission tomography scan. High resolution respirometry was performed to assess functionally mitochondrial respiratory states and respiratory control ratio (RCR) in synaptosomes fractions. Also, hypothalamic immunocontent of AMPK, pAMPK^{T172}, Beclin-1 and BCL-2 LC3 was assessed. Results demonstrate that aged animals did not display alterations nor in ¹⁸FDG uptake, neither in mitochondrial respiratory states. Also, aged mice displayed reduced pAMPK^{T172}/ AMPK ratio, and increased LC3-II compared to adult controls. ND in aged mice did neither increase ¹⁸FDG uptake, nor alter mitochondrial states. Albeit, ND increased pAMPK^{T172}/ AMPK ratio, LC3-II turnover, as well as increased RCR. This suggest that aging does not culminate necessarily in bioenergetics alterations in brain, although biomarkers of energetic status and autophagy are reduced. ND improved ATP synthesis and autophagy in aged mice. These benefits are probably mediated by reprogramming of AMPK signalling.

Key-words: Aging, Mitochondrial Bioenergetics, Autophagy, Nandrolone Decanoate.

INTRODUCTION

During the last century, worldwide populational aging increased drastically. In some countries, individuals with 60 years or more already corresponded to 19% ¹. Such dramatic increase urge for a deeper understanding of the biological mechanisms underlying aging. This is particularly important because aging is a risk factor for cardiovascular and neurodegenerative disorders.

Healthy aging has been characterized by a series of biochemical alterations, of which mitochondrial dysfunction, abnormal nutrient sensing and loss of proteostasis may be named, albeit still some pieces of the puzzle remains missing. However, the exacerbation of these alterations is the potential mechanistic core of age-related disorders linked with accumulation of neurotoxic protein aggregates, such as hyperphosphorylated tau and A β senile plaques ². Whilst the accumulation of neurotoxic proteins leads to neurodegeneration, autophagy (ATG) is the main intracellular mechanism responsible for the degradation of protein aggregates ³. Autophagy respond to a plethora of stressful events such as starvation or insults leading to accumulation of macromolecules ^{4,5}. However, there is also exist basal activation of autophagy, which is necessary to promote physiological recycling of the cellular content, such as proteins and organelles ⁶.

A reduction in overall autophagic flux has been consistently demonstrated in aged humans and rodents ⁷⁻⁹ whereas strategies to improve autophagy may increase lifespan in different experimental models ^{4,10-12}. The autophagic flux can be regulated by multiple intracellular signaling pathways being the AKT/PI3K/mTOR a key inhibitory signal ¹³⁻¹⁵. Moreover, there is also mTOR-independent regulation of autophagy, which is linked to both AMP-activated protein kinase (AMPK) mediating phosphorylation of ULK-1, a protein necessary for autophagic initiation ¹⁶, and Beclin-

1, a protein important for two steps of autophagic flux, being counterbalanced by anti-apoptotic protein BCL-2⁹. Regarding AMPK, It can be assumed that whereas its activation increases lifespan in different aging models, a reduction in AMPK responsiveness has been observed in aged tissues^{17,18}.

Remarkably, AMPK interplays with mitochondrial bioenergetics, and may serve as cellular sensor of energy availability. Such physiological roles are disturbed during the aging process. AMPK relies on its relationship with intracellular AMP levels, which is dependent of the energy balance (ATP/ADP ratio). Once activated AMPK initiates plethora of mechanisms such as membrane glucose transporter type 4 (GLUT4) translocation, increasing glucose uptake, as well as induction of glycolysis by phosphorylating PFKFB, one of the rate-limiting steps of glycolysis; aiming to increase reactions leading to ATP production by oxidative and non-oxidative metabolism.

In key brain regions like the hypothalamus, the AMPK activity responds to endocrine regulation and to energetic fluctuations¹⁹⁻²¹. Interestingly, downregulation of ATG and abnormal energetic homeostasis during aging parallel with altered hypothalamic activity^{22,23} as well as reduction in the hypophysis-hypothalamic-gonadal signaling, which in males lowers testosterone levels²⁴. This concept has been the mechanistic basis to propose exogenous administration of androgenic anabolic steroids (AAS)²⁵ to improve bioenergetic mechanisms in peripheral tissues²⁶⁻²⁹. However, although testosterone synthetic analogs replacement therapy (TRT) has been considered to decrease aging processes, its potential benefits to brain bioenergetics decline and loss of proteostasis during aging remains elusive.

In this study we sought to investigate whether nandrolone administration, a testosterone synthetic analog, influences the interactions between cerebral glucose

uptake, mitochondrial respiratory complexes activities and autophagic mechanisms in aged mice.

METHODS

Animal procedures:

Albino CF1 mice of 3, and 18 months of age were randomly selected to receive either subcutaneous administration of a synthetic analog of testosterone, nandrolone decanoate (18m / ND) (Decadurabolin[®], Schering-Plough, Brazil) in the dosage of 15mg/kg, or equivalent volume of administration vehicle (Corn oil, Salada[™], Bunge, Brazil) once a day for 15 consecutive days. Animals were maintained with in plexiglass cages, with an average of 4 littermates, and *ad libitum* access to water and standard chow. Following pharmacologic treatment animals were sacrificed and left cerebral hemisphere was homogenized for synaptosomes fractionation which was used for mitochondrial respirometry, and hypothalamus was dissected and homogenized for immunoblotting assays. All procedures were performed with approval of UFRGS ethics comitee for animal experimentation (CEUA UFRGS #33762)

Synaptosomes Fractionation

Animal's left hemisphere were rapidly dissected and homogenized in 1000 μ L of isolation buffer (320mM sucrose, 10mM Tris, 0,1% BSA, pH 7.4) using a 10 mL glass potter. The brain tissue was gently homogenized with 10 strokes. The homogenate was immediately used for respirometry, and protein quantification for the subsequent normalization of oxygen consumption per mg of tissue.

For synaptosomes isolation, homogenized samples were then centrifuged at 1330 ×g for 3 min. The supernatant was carefully retained and then centrifuged at 21,200 ×g for 10 min. The resulting pellet was resuspended, carefully layered on top of a discontinuous Percoll gradient, and centrifuged for 5 min at 30,700 ×g [11, 12]. This results in a synaptosome-enriched band and extra-synaptic mitochondria enriched band. The synaptosomal and mitochondrial fractions were transferred and resuspended in the isolation buffer and centrifuged for additional 16,900 ×g for 10 min. The resulting pellet was resuspended in 2mL isolation buffer and centrifuged at 6,500 ×g for 10 min. The final pellet of synaptosomes fraction was resuspended in a sucrose and Tris buffer (320mM sucrose, 10mM Tris, pH 7.4) and immediately used for further analysis.^{30,31}

microPET-Scan analysis

Non-pharmacologically treated mice were submitted to baseline [¹⁸F]FDG uptake evaluation using positron emission tomography scans (microPET), performed at the Brain Institute (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). The same animals were resubmitted to [¹⁸F]FDG uptake scans after 15 days. Prior to both paired scans, animals were fasted overnight, but had *ad libitum* access to water. Animals were placed on a controlled temperature environment, and an intraperitoneal injection of 200µL of [¹⁸F]FDG, with radioactive activity of 240µCi approximately, was made, allowing conscious drug uptake for 40 min. Animals were then anesthetized (Ketamine/Xylazine 90mg/kg and 7.5mg/kg respectively) and microPET-Scans performed^{32,33}.

High Resolution Respirometry Analysis

High resolution respirometry was performed using an O2k Fluoroxigraph (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) utilizing a SUIT (substrate, uncoupler inhibitor titration) protocol to assess specific mitochondrial respiratory states as described by Chance *et al*³⁴, and redefined by Gnaiger *et al*³⁵. Synaptosomes obtained from the left cerebral hemisphere were submitted to sequential addition of substrates of cellular respiration (Pyruvate 5mM, Malate 5mM, Glutamate 10mM, Succinate 10mM, ADP 2,5mM) followed by the titration with an uncoupler (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone 0,25 μ M, FCCP) until maximum oxygen consumption was obtained, as well as inhibitors of ATP-Synthase (Olygomycin 2 μ g/mL), and Cytochrome C oxidase inhibitor (KCN 5 mM) to assess non-mitochondrial oxygen consumption. The analysis was performed in 300 μ L of synaptosomes fraction suspended in 2mL of respiration buffer (KCl 100 mM, mannitol 75 mM, sucrose 25 mM, KH_2PO_4 5 mM, EDTA 0.05 mM, and Tris-HCl 10 mM, pH 7.4). Respiratory control ratio (RCR) was calculated as $\text{RCR}=\text{P}/\text{L}$, with P corresponding to maximum coupled respiratory capacity, when samples had access to exogenous energetic substrates, as well as ADP (P), and (L) corresponding to leak respiration, when samples had access to energetic substrates, but oxygen consumption was not related to ATP production due to the absence of available ADP for ATP-synthase reaction.

Immunoblotting Analysis

Dissected hypothalamic tissue was homogenized in NP-40 homogenizing buffer and submitted to 12 % acrylamide/bis-acrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE, transferred and analyzed in nitrocellulose membranes. Membranes were

blocked according to each antibody data sheet. 25µg of each sample was submitted to incubation overnight at 4 °C, with LC3A/B (Cell Signaling[®], USA, 1:1000), AMPKα2 (Cell Signaling[®], USA, 1:1000), pAMPKα2 (T172) (Cell Signaling[®], USA, 1:1000), Beclin-1 (Cell Signaling[®], USA, 1:1000) and BCL-2 (Cell Signaling[®], USA, 1:1000). After overnight incubation membranes were washed with 1x TTBS and placed in a 1:25000 secondary HRP conjugated IgG anti-rabbit, or anti-mouse solution (GE Healthcare[®], Sweden), accordingly to primary antibody datasheet specification. Western blotting analysis was shown as % of control optic density, analyzed using ImageJ software, normalized with loading control β-actin HRP-linked primary antibody (1:10000, Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, MO, USA), according with instruction of the manufacturer.

Statistical Analysis

Due to the nature of the presented data, multiple comparisons One-way or Two-way Analysis of Variance (ANOVA) were performed where applicable, followed by *post hoc* Tuckey teste, with significance being considered when $p < 0.05$, and normality assessed according to Kolmogorov-Smirnov normality statistical test. All results in figures are presented as mean \pm SEM.

RESULTS

Aging did not alter cerebral glucose uptake.

At baseline, aged mice displayed no reduction in FDG uptake neither in brain specific structures nor in whole hemisphere when compared to adult control mice (Two-Way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey, $p > 0.05$; 3m / VEH, n=10; 3m / ND, n=5; 18m / VEH n=4; 18m / ND n=5) (Figure 1 and 3), implying that

physiological aging apparently does not disturb mechanisms associated with glucose transport through the neural cell membranes.

Paired micro-PET scan reanalysis after 15 days of ND supplementation showed an increase in the FDG uptake in specific brain structures in adult mice relative to adult control mice (Cortex (CTX; $p=0.0280$); Striatum (RSTR; $p=0.0021$; LSTR; $p=0.0011$)) (Two-way ANOVA, 3m / ND vs 3m VEH). On opposite, aged mice supplemented with ND did not show brain specific benefits in the FDG uptake ((Cortex (CTX; $p=0.8046$); Striatum (RSTR; $p=0.3405$; LSTR; $p=0.5031$)) (Two-way ANOVA, 18m / ND vs 3m VEH) (Figure 2). The same FDG uptake profile was observed in the whole hemisphere of adult ND supplemented mice (3m / VEH vs. 3m / ND $p=0.0005$; 3m / ND vs. 18m / VEH $p=0.0115$; 3m / ND vs. 18m / ND $p=0.0038$), (figure 3) suggesting that ND supplementation does not benefit glucose uptake only in the aged brain (Two-Way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, $n=10$; 3m / ND, $n=5$; 18m / VEH $n=4$; 18m / ND $n=5$).

Aging does not induce mitochondrial bioenergetics decline

Coupled to FDG analysis, animals synaptosomes obtained from whole cerebral hemisphere were submitted to oxygraphic analysis. ND induced increases in the mitochondrial Routine oxygen consumption rates (OCR) in adult mice (3 m / ND, $n=3$) as compared to control adult mice (3m / VEH, $n=8$) (Two-Way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey, 3m / VEH vs 3m / ND $*p=0.007$). On opposite, ND supplementation in aged mice did not increase OCR in the routine state (Figure 4).

Regardless of pharmacological supplementation, aged mice displayed similar OCR in the assessed mitochondrial respiratory states. Also, the energetic efficiency assessed through the RCR was not significantly different between aged animals.

However, aged animals supplemented with ND displayed a significant increase in RCR relative to adult controls (3m / VEH vs 18m / ND; $p=0.0216$), and a tendency to increase when compared to adult ND mice (3m / ND vs 18m / ND; $p=0.0687$) (One-way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, $n=8$; 3m / ND, $n=3$; 18m / VEH $n=4$; 18m / ND $n=5$) (Figure 5).

Nandrolone attenuated AMPK downregulation in aged mice.

The significant decrease of hypothalamic pAMPK(Thr172)/AMPK ratio indicates a lower AMPK responsiveness in aged animals (18m / VEH) as compared with adult controls (3m / VEH). ND attenuated aged-induced AMPK downregulation (18m / ND) (3m / VEH vs. 18m / VEH $p=0.0013$; 3m / VEH vs. 18m / ND $p=0.0607$) (3m / VEH vs. 18m / VEH $*p=0.0011$; 3m / VEH vs. 18m / ND $p=0.0607$), (One-way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, $n=5$; 18m / VEH $n=3$; 18m / ND $n=5$) (Figure 6).

Nandrolone attenuates autophagosome accumulation due to aging.

Western blot analysis of LC3 immunocontent indicates an increase in the lipidated form of LC3, LC3-II, present in mature autophagosomes, in aged animals (18m / VEH $n=3$) as compared to controls (3m / VEH $n=5$); whilst 15 days nandrolone supplementation attenuates aging impact in autophagic turnover (18m / ND $n=5$), as (Figure 7) (3m / VEH vs 18m / VEH $p=0.0467$; 3m / VEH vs 18m / ND $p=0.2455$) (3m / VEH vs. 18m / VEH $*p=0.0011$; 3m / VEH vs. 18m / ND $p=0.0607$), (One-way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, $n=5$; 18m / VEH $n=3$; 18m / ND $n=5$).

Autophagic flux induction by ND is Beclin-independent

Western blot analysis of Beclin-1 and BCL-2 immunocontent indicates an increase in both Beclin-1 and BCL-2 in aged animals as compared to controls, regardless of ND supplementation (Figure 8.A and B) (Beclin: 3m / VEH vs 18m / VEH $p=0.0025$; 3m / VEH vs 18m / ND $p=0.0104$; Bcl-2: 3m / VEH vs 18m / VEH $p=0.0088$; 3m / VEH vs 18m / ND $p=0.0026$). The Beclin-1/BCL-2 immunocontent ratio was not affected nor by aging, neither by ND supplementation in aging mice as compared to adult controls (3m / VEH vs 18m / VEH $p=0.9201$; 3m / VEH vs 18m / ND $p=0.6931$) (Fig. 8C). (One-way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, $n=5$; 18m / VEH $n=4$; 18m / ND $n=5$).

Discussion

We found that 18-month aged mice did not display a significant decrease in focal cerebral glucose uptake (FDG). Actually, recent works have showed that unlike in humans, cerebral metabolism in mice does not follow a linearly time-dependent trend, instead, progress at an initially increasing FDG uptake levels, leading to hypermetabolism. This hypermetabolism is more preeminent in middle aged mice (14 months). From this point, FDG uptake started to decay and by 20 months of age already displayed levels as adult 5 months²³.

Moreover, our data shows that ND supplementation in adult mice induced increases in cerebral FDG uptake. Although to our knowledge no previous works have addressed the central effects of nandrolone in FDG-uptake, previous works indicate that testosterone supplementation induces increase in the FDG uptake, thus restoring

regional hypometabolism in the brain of both male and female adult humans^{27,36}. We were able to replicate this finding in adult male mice.

Curiously, our results show that ND does not benefit aged mice in terms of FDG uptake, which is a result that has not been previously reported in the literature. The effect of testosterone replacement therapy (TRT) on FDG uptake in cognitively-impaired Alzheimer disease patients or eugonadal patients was already investigated. These studies showed that TRT induced increases in cerebral FDG uptake in these patients^{37,38}. Hence, the differences observed between our results regarding the androgen hormones mediating FDG uptake and hypometabolism may shed light onto different brain metabolic responses between aged human and mice. Additionally, it has been proposed that the effects of testosterone in cerebral FDG uptake might actually be related to its estrogen-receptor binding metabolites, since the apparent effect of testosterone is blunted with concomitant administration of aromatase inhibitor³⁹. Our study may be influenced by the lower affinity of ND to aromatase enzyme thus showing a reduced estrogenic signalling when compared to testosterone⁴⁰. Taken into consideration these issues, we can assume that ND supplementation does not benefit FDG uptake in aged mice brain.

The increased glucose uptake does not necessarily indicate hypermetabolism; once glucose uptake is only the initial step of a series of catabolic and anabolic pathways. In agreement with this, some reactions guide intermediates of both glycolytic pathway and tricarboxylic cycle to other metabolic routes related or not to energy metabolism such as amino acid and fatty acid synthesis, and pentose phosphate pathway^{41,42}. The [¹⁸F]FDG is a radioactive analog of glucose, that is substrate for hexokinase, thus producing [¹⁸F]FDG-6-Phosphate, which unlike its analog Glucose-6-Phosphate, is a false substrate to further reactions, allowing the

accumulation of [^{18}F]FDG-6-P, an indicator of glucose uptake ⁴³. To further estimate the possible positive outcomes of ND supplementation in aged brain bioenergetics, we performed high resolution respirometry analysis in mitochondria enriched nerve terminals, which allows a wide perspective of the oxidative metabolic machinery beyond that of hexokinase activity. Therefore, in the adult mice we observed that ND supplementation increased the routine oxygen consumption rate (OCR) related to endogenously available substrates (R), which is coincident with the increased FDG uptake aforementioned. Such data reinforce the notion that routine respiration sustains physiological cell growth energetic requirements, which is an expected effect yield by a potent anabolic hormone. In contrast, ND supplementation in aged mice did not lead to OCR alterations in any of the mitochondrial states as well did not improve FDG uptake. The ND supplementation increased RCR levels in the aged mice compared to adult controls.

Moreover, the absence of RCR and respiratory states alterations in aged animals has been previously described in other rodents strains, including Fischer 344 rats and C57/BL6 mice ⁴⁴⁻⁴⁷. However, there are still controversies since studies in albino Swiss mice and Wistar rats showed reduced RCR and maximal coupled oxygen consumption (mitochondrial respiratory P state OCR) ⁴⁸⁻⁵¹. A recent work published by Holloway *et al* ⁵² suggests that bioenergetic alterations observed in the skeletal muscle of aged male do not translate directly into RCR alterations, due to the fact that alterations in the aging bioenergetics may involve an insensitivity of mitochondrial ATP synthase to ADP developed through lifespan. However, it should be taken into consideration the tissue specific responses of mitochondria, once we used synaptosomes challenged with saturated concentrations of ADP, and our RCR data are aligned with other published works.

The reported insensitivity to ADP, along with the previously described downregulation of adenylate kinase⁵³ in aged individuals likely reflects an increased ATP/ADP and decreased ATP/AMP ratios. A mechanistic consequence of decreased ATP/AMP ratio is a reduced activation of AMPK, a protein kinase that work to restore energetic homeostasis⁵⁴. We showed that aged animals present normal brain mitochondrial bioenergetics but decreased pAMPK (T172)/AMPK ratios in the hypothalamus, a proxy indicator of AMPK activation. Albeit we did not evaluate ADP sensitivity, it could mechanistically explain the decreased AMPK activation regardless of bioenergetic abnormalities, as it was proposed by Holloway. Interestingly, we observed that ND increased AMPK activation in aged animals and also the respiratory control ratio (RCR), which is a biochemical outcome associated with ND supplementation in other tissues, but not in brain^{55,56}.

AMPK is not only a regulator of bioenergetics homeostasis, but also a link between cellular energetics and autophagic flux. AMPK activation drives forward autophagic flux.⁵⁷ Data showed inhibition of AMPK activation in aged mice hypothalamus concomitantly to an increase in LC3II accumulation, which once combined, indicates a impaired autophagic flux as previous showed in aged rodents⁵⁸⁻⁶⁰. ND supplementation induced AMPK activation, leading to attenuation of LC3-II accumulation. This increase in autophagic flux would benefit the turnover of cellular content, such as malfunctioned mitochondria, culminating in more efficiency in the oxygen consumption coupled with ATP production, here exemplified by the increase in RCR without requirement of increase glucose uptake^{61,62}.

We then sought to investigate whether ND supplementation could induce autophagic flux through alternative mechanistic pathways. Beclin-1 is an important regulator of autophagy initiation, and is inhibited by the anti-autophagic protein BCL-

2. Our results indicate increased Beclin-1 and BCL-2 immunoccontent in aged animals, regardless of ND supplementation. As the induction of autophagic flux by Beclin-1 is inhibited by BCL-2 binding, the relative immunoccontent ratio could indicate the predominance of free Beclin-1, which results in increased autophagic flux. Here we show that Beclin-1/BCL-2 ratio is unaltered in hypothalamus of aged mice. Also we show that the supplementation of ND does not increase Beclin-1/BCL-2 ratio.

Unlike the decrease observed in human aging, the increased Beclin-1 immunoccontent ratio in mice could be explained by sequestration of dysfunctional beclin-1 in neurons, that has been already demonstrated in mice⁶³. Also, increased Beclin-1 immunoccontent could be counterbalanced by the increased Bcl-2⁶⁴, explaining the overall reduction in autophagy. Autophagic flux increase by ND supplementation was not accompanied by increased Beclin-1/Bcl-2 ratios, suggesting to ND a Beclin-1 independent autophagy induction mechanism.

Taken together our results provides evidences for normal brain glucose uptake and lack of mitochondrial bioenergetics alterations in the aged mice concomitantly with downregulation of AMPK activity and impaired autophagic flux in hypothalamus. ND supplementation improved bioenergetic efficiency and AMPK activation increasing the autophagic flux in aged mice.

In conclusion, the benefits of ND supplementation to brain energy production and autophagic flux is mediated by AMPK activation reprogramming

References:

1. Ferrucci, L., Giallauria, F. & Guralnik, J. M. Epidemiology of Aging. *Radiologic clinics of North America* **46**, 643–v (2008).
2. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
3. Rubinsztein, D. C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**, 780–786 (2006).
4. Yang, F. *et al.* MTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. *Behav. Brain Res.* **264**, 82–90 (2014).
5. Yang, D. *et al.* Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer ' s disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. 258–277 (2011). doi:10.1093/brain/awq341
6. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 124–31 (2010).
7. Taylor, R. C. & Dillin, A. Aging as an Event of Proteostasis Collapse. **1**, 1–17 (2011).
8. Terman, A. Lipofuscin : Mechanisms of formation and increase with age. (1998).
9. Salminen, A., Kaarniranta, K. & Kauppinen, A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process. *Aging Res. Rev.* **12**, 520–534 (2013).
10. Stambler, I. The unexpected outcomes of anti-aging, rejuvenation, and life extension studies: an origin of modern therapies. *Rejuvenation Res.* **17**, 297–

- 305 (2014).
11. Salminen, A. & Kaarniranta, K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Aging Res. Rev.* **11**, 230–241 (2012).
 12. Kenyon, C. The Plasticity of Aging : Insights from Long-Lived Mutants. **120**, 449–460 (2005).
 13. Roczniak-Ferguson, A. *et al.* The Transcription Factor TFEB Links mTORC1 Signaling to Transcriptional Control of Lysosome Homeostasis. *Sci. Signal.* **5**, ra42-ra42 (2012).
 14. White, J. P. *et al.* Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **365**, 174–186 (2013).
 15. Zoncu, R. mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids. **678**, (2013).
 16. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Publ. Gr.* **13**, 132–141 (2011).
 17. Reznick, R. M. *et al.* Aging-Associated Reductions in AMP-Activated Protein Kinase Activity and Mitochondrial Biogenesis. *Cell Metab.* **5**, 151–156 (2007).
 18. Liu, F. *et al.* Age-related changes in AMP-activated protein kinase after stroke. *Age (Omaha)*. **34**, 157–168 (2012).
 19. Lage, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A. & Lopez, M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol. Med.* **14**, 539–549 (2008).
 20. López, M., Nogueiras, R., Tena-sempere, M. & Diéguez, C. Hypothalamic AMPK : a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat. Publ. Gr.* **12**, 421–432 (2016).

21. Hardie, D. G., Ross, F. A. & Hawley, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 251–262 (2012).
22. Kakimoto, A. *et al.* Age-Related Sex-Specific Changes in Brain Metabolism and Morphology. 221–226 (2016). doi:10.2967/jnumed.115.166439
23. Brendel, M. *et al.* Time Courses of Cortical Glucose Metabolism and Microglial Activity Across the Life-Span of Wild-Type Mice: A PET Study. *J. Nucl. Med.* **49**, jnumed.117.195107 (2017).
24. Mitchell, R., Hollis, S., Rothwell, C. & Robertson, W. R. Age related changes in the pituitary-testicular axis in normal men; lower serum testosterone results from decreased bioactive LH drive. *Clin Endocrinol* **42**, 501–507 (1995).
25. Brown-Séquard, C. Du rôle physiologique et thérapeutique d'un suc extrait de testicules d'animaux d'après nombre des faix observés chez l'homme. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.* **1**, 739–746 (1899).
26. Bahrke, M. S., Lip, E. Y. & Wright, J. E. Psychological and Behavioural Effects of Endogenous Testosterone and Anabolic-Androgenic Steroids. **22**, 367–390 (1996).
27. Miller, K. K. *et al.* Testosterone administration attenuates regional brain hypometabolism in women with anorexia nervosa. **132**, 197–207 (2004).
28. Howell, S. J., Radford, J. A., Smets, E. M. A. & Shalet, S. M. Fatigue, sexual function and mood following treatment for haematological malignancy: the impact of mild Leydig cell dysfunction. *British Journal of Cancer* **82**, 789–793 (2000).
29. Burris, A., Banks, S., Carter, C., Davidson, J. & Sherins, R. A Long-term, Prospective Study of the Physiologic and Behavioural Effects of Hormone

- Replacement in Untreated Hypogonadal Men. *J. Androl.* **13**, 297–304 (1992).
30. Sims, N. R. & Anderson, M. F. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat. Protoc.* **3**, 1228–1239 (2008).
 31. Sims, N. R. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.* **55**, 698–707 (1990).
 32. Zanirati, G. *et al.* Depression comorbidity in epileptic rats is related to brain glucose hypometabolism and hypersynchronicity in the metabolic network architecture. *Epilepsia* (2018). doi:10.1111/epi.14057
 33. Silva, R. B. M. *et al.* Beneficial Effects of the Calcium Channel Blocker CTK 01512-2 in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 1–21 (2018). doi:10.1007/s12035-018-1049-1
 34. CHANCE, B. & WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217**, 383–93 (1955).
 35. Gnaiger, E. & Gnaiger, E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis.* (2012).
 36. Zitzmann, M., Weckesser, M., Schober, O. & Nieschlag, E. Changes in cerebral glucose metabolism and visuospatial capability in hypogonadal males under testosterone substitution therapy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **109**, 302–304 (2001).
 37. Tan, R. S. Testosterone effect on brain metabolism in elderly patients with Alzheimer’s disease: comparing two cases at different disease stages. *Aging Clin. Exp. Res.* **25**, 343–7 (2013).

38. Maki, P. M. *et al.* Intramuscular testosterone treatment in elderly men: evidence of memory decline and altered brain function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 4107–14 (2007).
39. Cherrier, M. M. *et al.* The role of aromatization in testosterone supplementation: Effects on cognition in older men. *Neurology* **64**, 290–296 (2005).
40. Clark, A. S. & Henderson, L. P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **27**, 413–36 (2003).
41. Gjedde, A. Does deoxyglucose uptake in the brain reflect energy metabolism? *Biochem. Pharmacol.* **36**, 1853–1861 (1987).
42. Marini, C. *et al.* Discovery of a novel glucose metabolism in cancer: The role of endoplasmic reticulum beyond glycolysis and pentose phosphate shunt. *Sci. Rep.* **6**, 25092 (2016).
43. Sokoloff, L. *et al.* THE [¹⁴ C]DEOXYGLUCOSE METHOD FOR THE MEASUREMENT OF LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION: THEORY, PROCEDURE, AND NORMAL VALUES IN THE CONSCIOUS AND ANESTHETIZED ALBINO RAT. *J. Neurochem.* **28**, 897–916 (1977).
44. Darnold, J. R., Vorbeck, M. L. & Martin, A. P. Effect of aging on the oxidative phosphorylation pathway. *Mech. Aging Dev.* **53**, 157–167 (1990).
45. Gilmer, L. K., Ansari, M. A., Roberts, K. N., Scheff, S. W. & Author, C. Age-related Changes in Mitochondrial Respiration and Oxidative Damage in the Cerebral Cortex of the Fischer 344 Rat. *Mech Aging Dev* **131**, 133–143 (2010).
46. Weindruch, R. H., Cheung, M. K., Verity, M. A. & Walford, R. L. Modification of mitochondrial respiration by aging and dietary restriction. *Mech. Aging Dev.* **12**, 375–92 (1980).

47. Meng, Q., Wong, Y. T., Chen, J. & Ruan, R. Age-related changes in mitochondrial function and antioxidative enzyme activity in fischer 344 rats. *Mech. Aging Dev.* **128**, 286–92 (2007).
48. Petrosillo, G., Matera, M., Casanova, G., Ruggiero, F. M. & Paradies, G. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochem. Int.* **53**, 126–31 (2008).
49. Petrosillo, G. *et al.* Melatonin prevents age-related mitochondrial dysfunction in rat brain via cardiolipin protection. *Rejuvenation Res.* **11**, 935–43 (2008).
50. Navarro, A. *et al.* Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R501-9 (2008).
51. Navarro, A. *et al.* Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R1392-9 (2005).
52. Holloway, G. P. *et al.* Age-Associated Impairments in Mitochondrial ADP Sensitivity Contribute to Redox Stress in Senescent Human Skeletal Muscle. *Cell Rep.* **22**, 2837–2848 (2018).
53. Kaczor, J. J. *et al.* The effect of aging on anaerobic and aerobic enzyme activities in human skeletal muscle. *Journals Gerontol.* **61**, 339–44 (2006).
54. Woods, A. *et al.* LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* **13**, 2004–8 (2003).
55. White, J. P. *et al.* Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **365**, 174–186 (2013).
56. Khan, A. S. & Frigo, D. E. A spatiotemporal hypothesis for the regulation, role and targeting of AMPK in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **14**, 164–180 (2017).
57. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K. AMPK and mTOR regulate

- autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Publ. Gr.* **13**, 132–141 (2011).
58. Schaeffer, V. *et al.* Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain* 2169–2177 (2012).
doi:10.1093/brain/aws143
59. García-prat, L. *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* **529**, 37–42 (2016).
60. Galluzzi, L., Pedro, J. M. B., Blomgren, K. & Kroemer, G. Autophagy in acute brain injury. *Nat. Publ. Gr.* **17**, 467–484 (2016).
61. Sin, J. *et al.* Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Autophagy* **12**, 369–80 (2016).
62. Hill, B. G. *et al.* Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol. Chem.* **393**, 1485–1512 (2012).
63. Shibata, M. *et al.* Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J. Biol. Chem.* **281**, 14474–85 (2006).
64. Salminen, A. *et al.* Progress in Neurobiology Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer ' s disease : The potential role of Beclin 1 interactome. *Prog. Neurobiol.* **106–107**, 33–54 (2013).

Figures subtitles:

Fig.1: Heatmap of FDG uptake in cerebral regions. Average FDG uptake as SUV detections in cerebral regions of adult (3m) and aged mice(18m), prior to ND or VEH supplementation. (**RSTR; LSTR**: Striatum, right and left respectively.) (**CTX**: Cortex) (**RHIP; LHIP**: Hippocampus, right and left respectively) (**THA**: Thalamus) (**CB**: Cerebellum) (**BFS**: Basal Forebrain & Septum) (**HYP**: Hypothalamus) (**RAMY; LAMY**: Amygdala, right and left respectively) (**BS**: Brainstem) (**CG**: Cingulate Gyrus) (**SC**: Superior Colliculi) (**OLF**: Olfactory bulb) (**RMID; LMID**: Midbrain, right and left respectively) (**RIC; LIC**: Inferior Colliculi, right and left respectively). Data is presented as Average SUV.

Fig.2: Heatmap of FDG uptake in cerebral regions. Average FDG uptake of cerebral regions in adult (3m) and aged mice(18m), 14 days after ND or VEH supplementation. A sharp increase in structure specific glucose uptake only in adult mice submitted to ND supplementation was observed as compared to adult controls (3m /ND vs 3m / VEH (Cortex (CTX; $p=0.0280$); Striatum (RSTR; $p=0.0021$; LSTR; $p=0.0011$)), whilst no uptake alterations in aged mice submitted to ND supplementation (3m/VEH vs 18m / ND; Cortex (CTX; $p=0.8046$); Striatum (RSTR; $p=0.3405$; LSTR; $p=0.5031$)) as compared to aged animals that received control treatment (Two-Way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, $n=10$; 3m / ND, $n=5$; 18m / VEH $n=4$; 18m / ND $n=5$). Data is presented as Average SUV.

Fig. 3: FDG uptake in the left hemisphere. Average FDG uptake values of left cerebral hemisphere structures, showing increased uptake in young animals submitted to ND supplementation as compared to all groups. * $p < 0.005$ (3m / VEH vs. 3m / ND $p = 0.0005$; 3m / ND vs. 18m / VEH $p = 0.0115$; 3m / ND vs. 18m / ND $p = 0.0038$), (Two-Way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, $n = 10$; 3m / ND, $n = 5$; 18m / VEH $n = 4$; 18m / ND $n = 5$) Results presented as mean \pm SEM.

Fig. 4: Mitochondrial respiratory states. The oxygen consumption rate as % of control (3m / VEH), in routine (R), leak (L), OXPHOS (P) and Complex II ETS linked oxygen consumption (CII), where alterations were only observed as in the Routine state on adult animals submitted to ND supplementation (Two-Way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey, 3m / VEH vs 3m / ND * $p = 0.007$; 3m / VEH, $n = 8$; 3m / ND, $n = 3$; 18m / VEH $n = 4$; 18m / ND $n = 5$) Results presented as mean \pm SEM.

Fig. 5: Respiratory control ratio (RCR). The RCR is represented as % of control (3m / VEH). ND Increased RCR values in aged mice relative to adult control mice (18m / VEH). (One-Way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey, 3m / VEH vs 18m / ND * $p = 0.021$; 3m / VEH, $n = 8$; 3m / ND, $n = 3$; 18m / VEH $n = 4$; 18m / ND $n = 5$) Results are presented as mean \pm SEM.

Fig. 6: AMPK activation in the hypothalamus. (A) pAMPK(T172)/AMPK immunocontent ratio is significantly lower in aged animals, relative to controls (3m / VEH) and was attenuated by ND supplementation. (3m / VEH vs. 18m / VEH * $p = 0.0011$; 3m / VEH vs. 18m / ND $p = 0.0607$), (One-way ANOVA Multiple

Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, n=5; 18m / VEH n=3; 18m / ND n=5) **(B)** Representative western blotting membrane of AMPK, pAMPK(T172) and loading control β -actin. Results are presented as mean \pm SEM.

Fig. 7: Markers of autophagy flux. (A) LC3 immunocontent, indicates an increase in the lipidated form of LC3, LC3-II, present in mature autophagosomes, in aged animals (18m / VEH n=3) as compared to controls (3m / VEH n=5); 15 days nandrolone supplementation attenuates aging impact in autophagic turnover (18m / ND n=5), (3m / VEH vs 18m / VEH *p=0.0467; 3m / VEH vs 18m / ND p=0.2455), (One-way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, n=5; 18m / VEH n=3; 18m / ND n=5). **(B)** Representative western blotting membrane of LC3-I, LC3-II and loading control β -actin. Results presented as mean \pm SEM.

Fig. 8 Beclin-1 independent mechanism of ND: Immunocontent increase in both **(A) Beclin-1** and **(B) BCL-2** in aged animals as compared to controls, regardless of ND supplementation. *p<0.005 ((**A**)Beclin: 3m / VEH vs 18m / VEH p=0.0025; 3m / VEH vs 18m / ND p=0.0104) (**B**)Bcl-2: 3m / VEH vs 18m / VEH p=0.0088; 3m / VEH vs 18m / ND p=0.0026). **(C) Beclin-1/BCL-2 Ratio** was not affected nor by aging, neither by ND supplementation in aging mice as compared to adult controls (3m / VEH vs 18m / VEH p=0.9201; 3m / VEH vs 18m / ND p=0.6931) (One-way ANOVA Multiple Comparisons, *Post-hoc* Tukey; 3m / VEH, n=5; 18m / VEH n=4; 18m / ND n=5). **(D)** Representative western blotting membrane of Beclin-1, BCL-2 and loading control β -actin. Results presented as mean \pm SEM.

Figures:

Fig.1

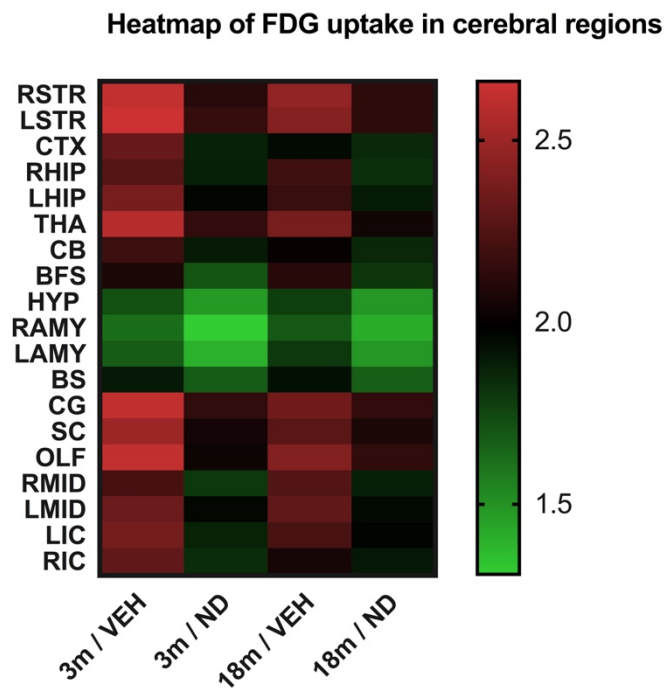


Fig. 2

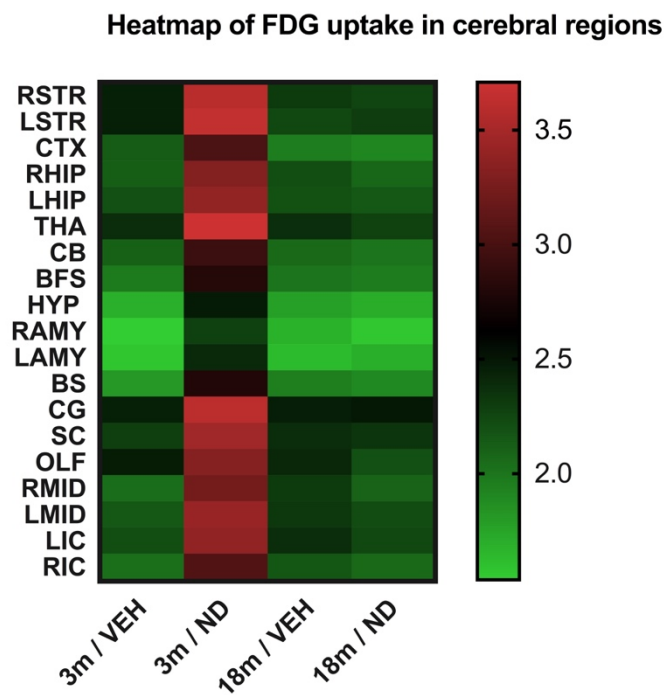


Fig. 3

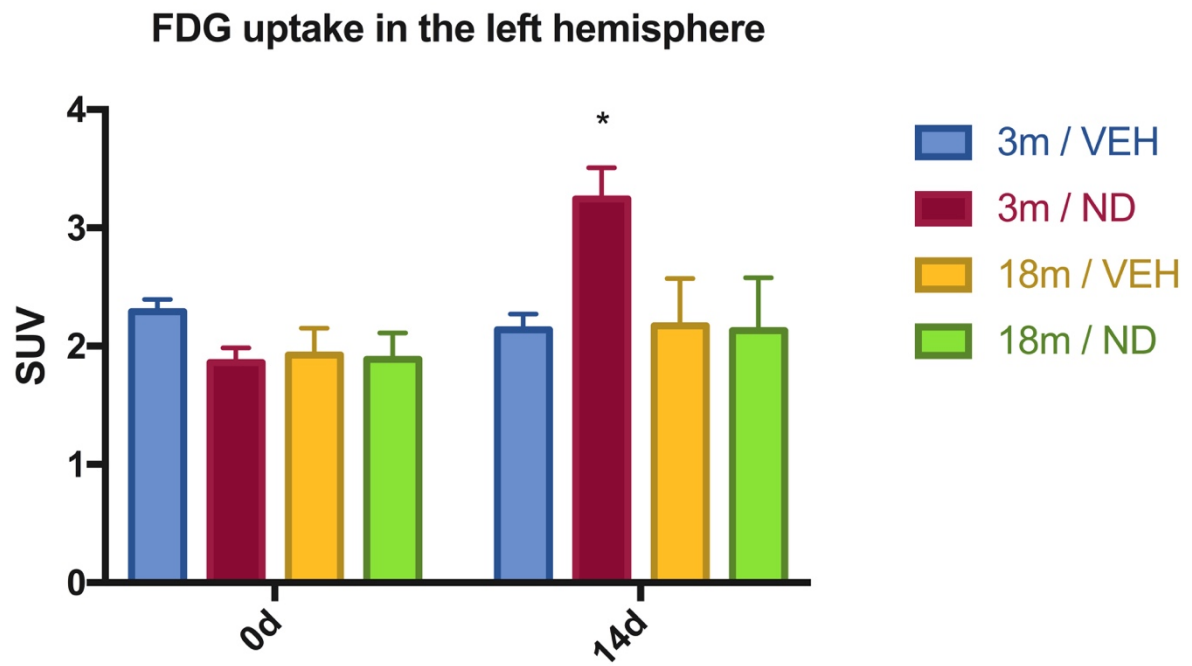


Fig. 4

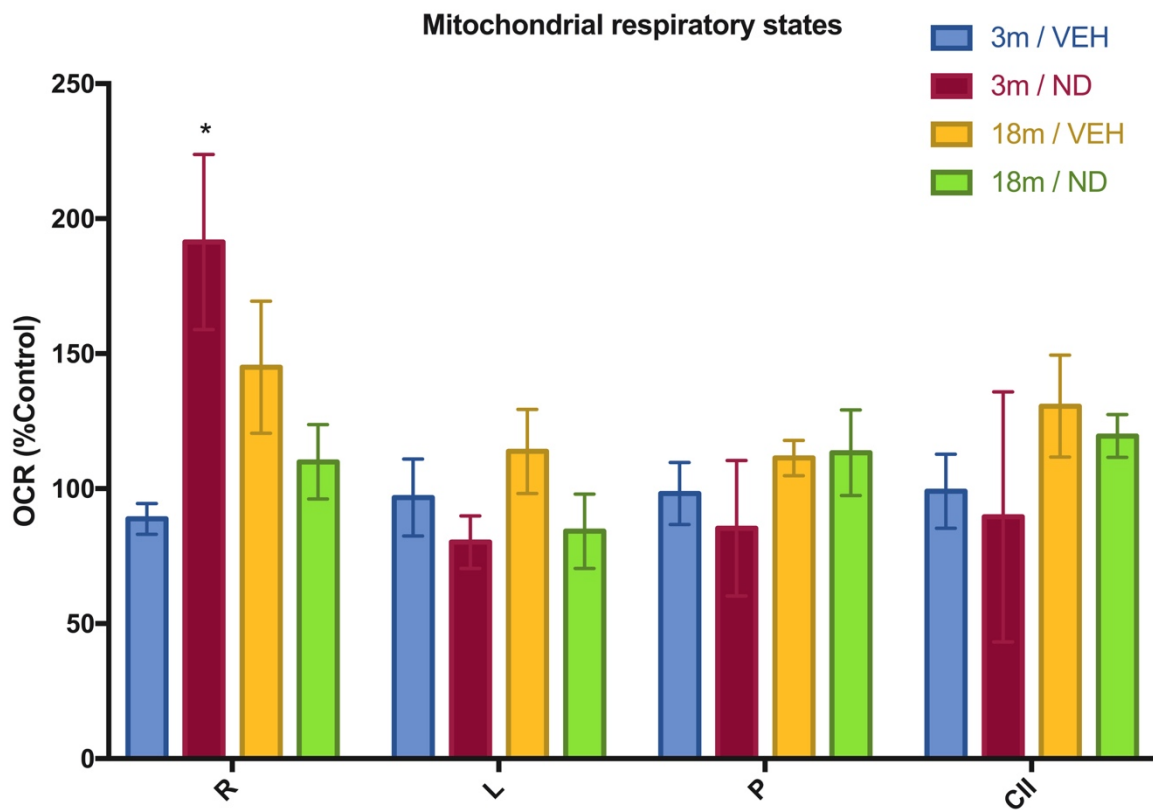


Fig. 5

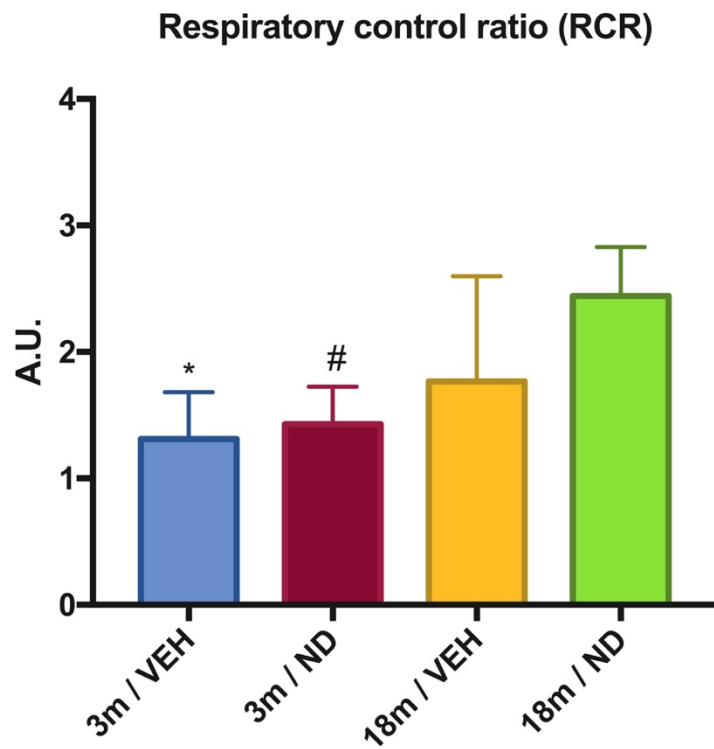
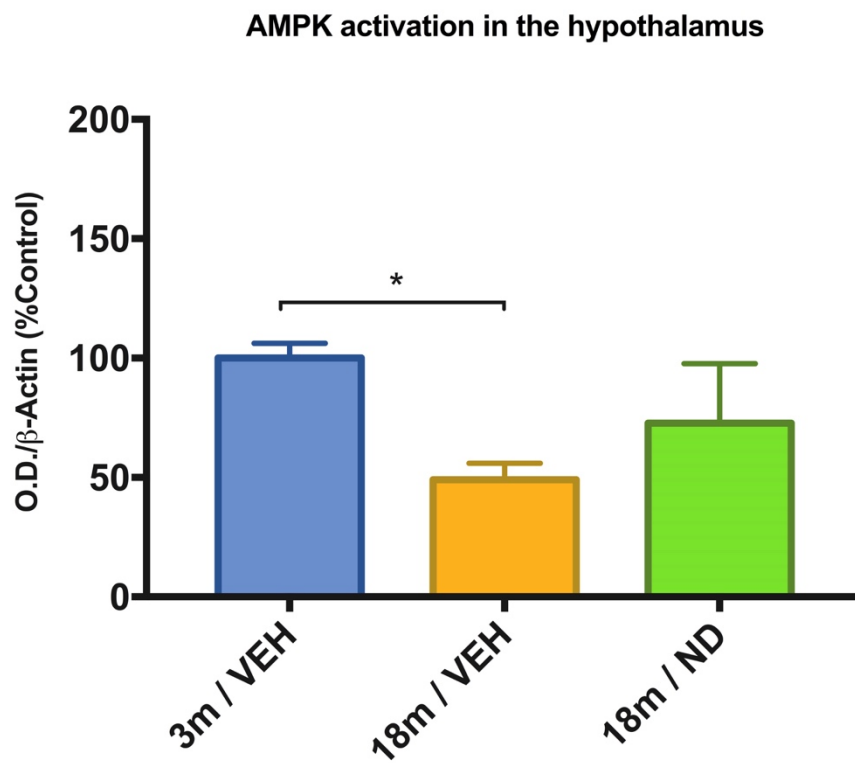


Fig. 6

A)



B)

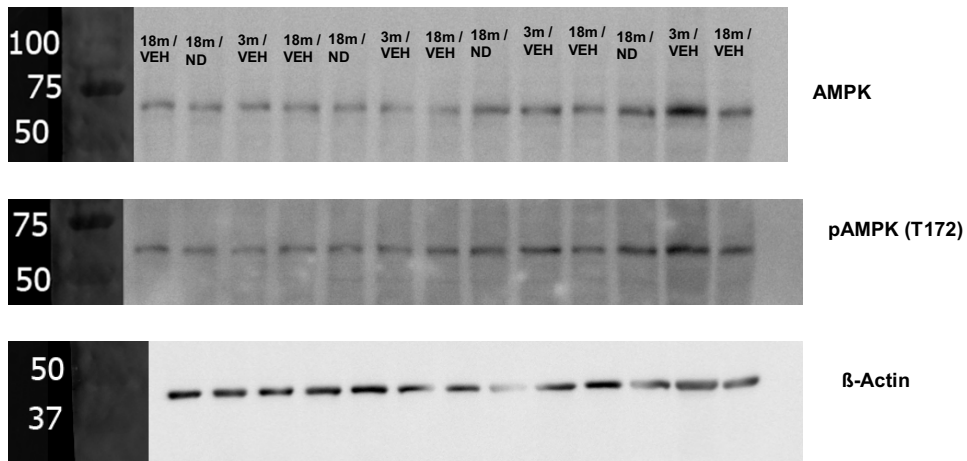
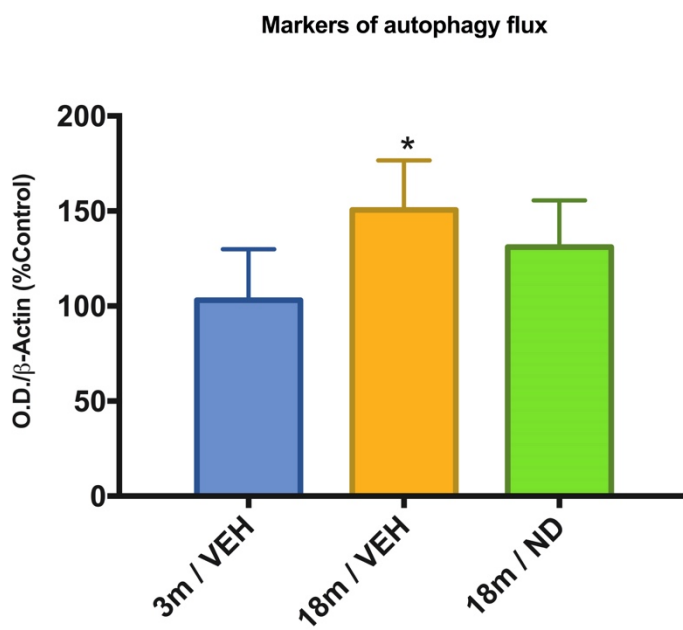


Fig. 7

A)



B)

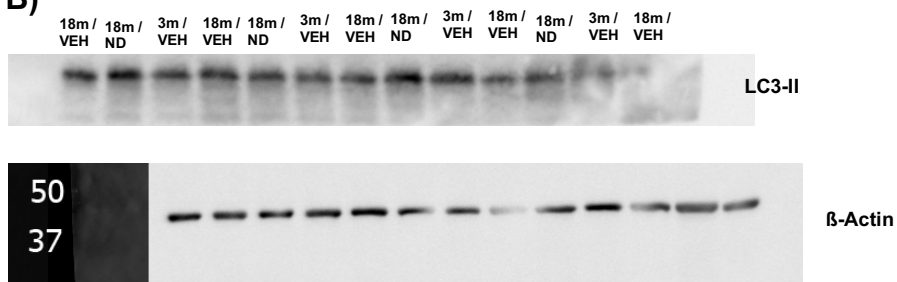
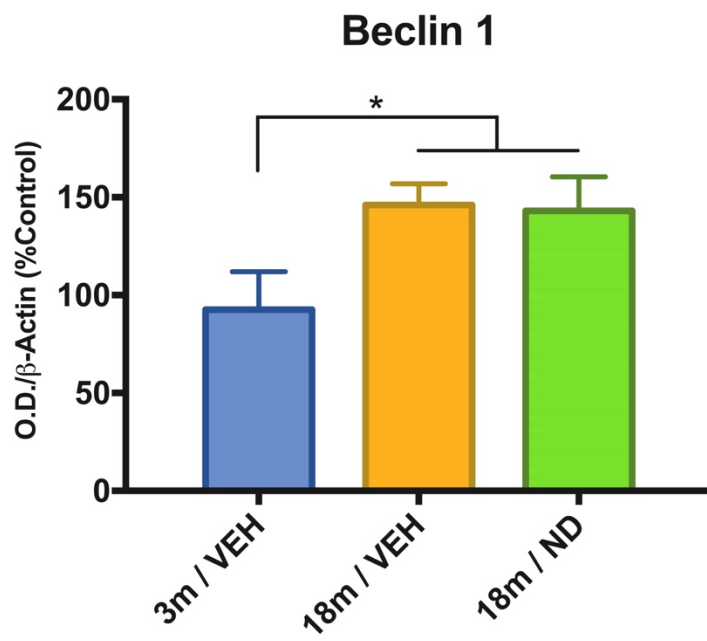
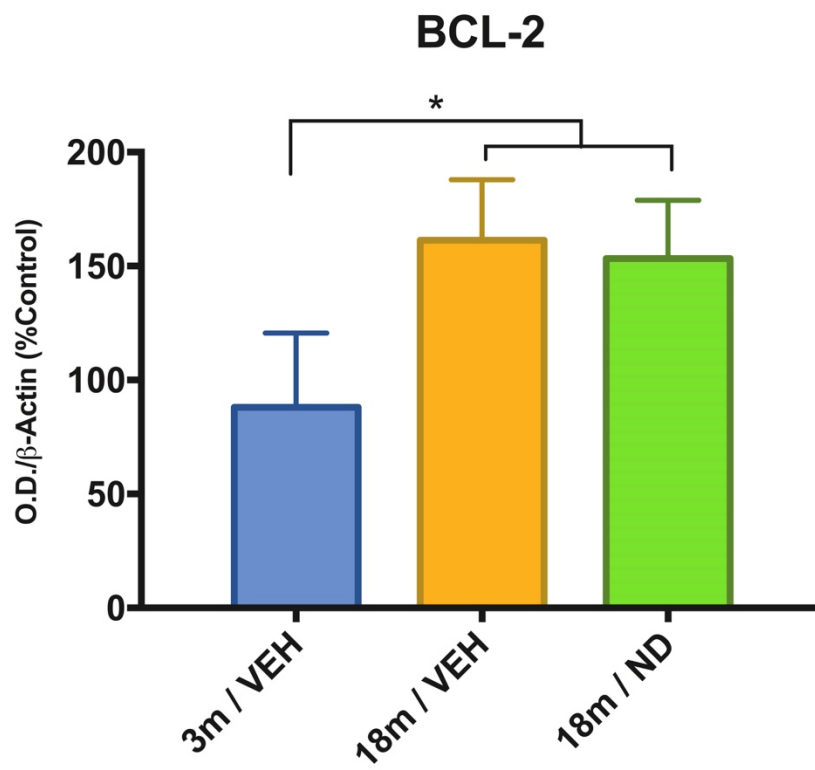


Fig. 8 Beclin-Independent Mechanism of ND

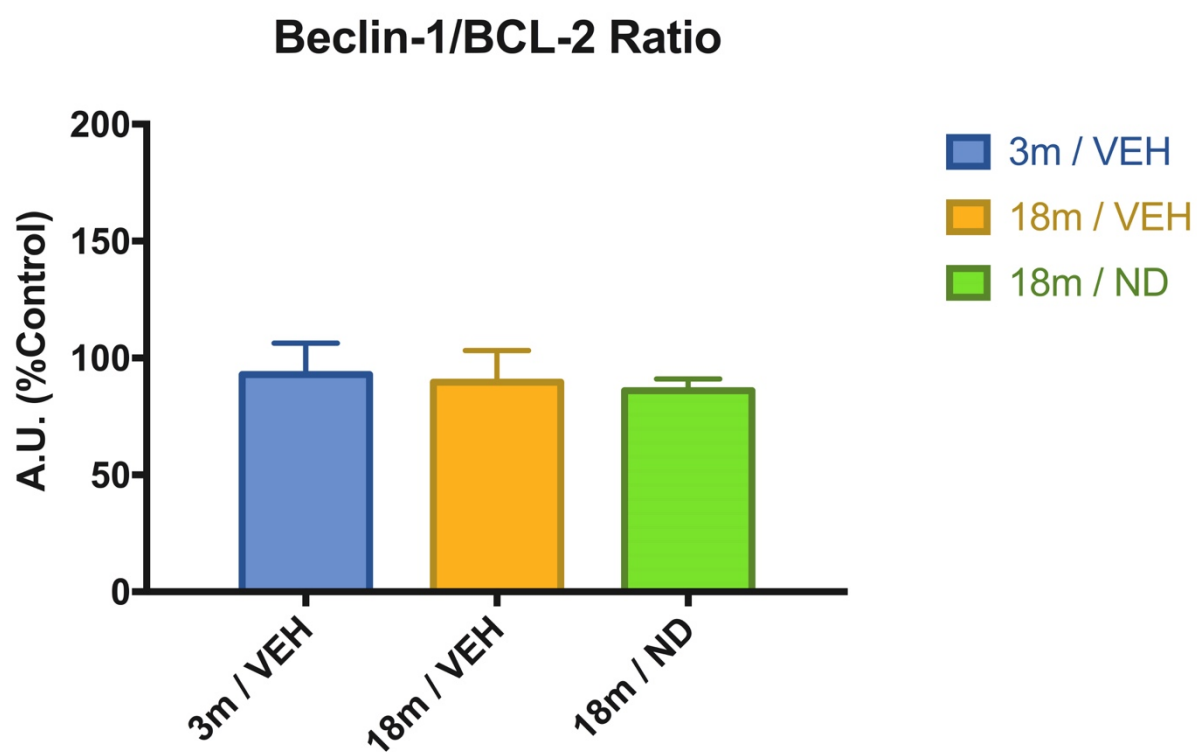
A)



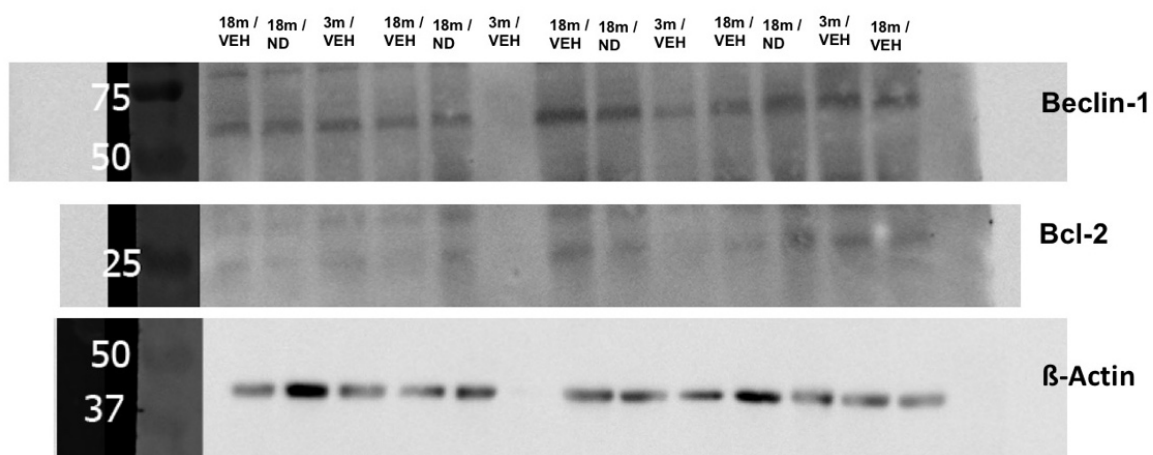
(B)



(C)



D)



Capítulo III

DISCUSSÃO

Aqui mostramos que os camundongos envelhecidos não apresentam alterações significativas na captação de FDG cerebral. Nossos resultados reforçam o conceito que diferentemente dos humanos, camundongos não apresentam uma redução linear na captação de FDG cerebral como consequência do envelhecimento, apresentando na realidade um aumento na captação, a qual já esta normalizada ao nível dos controles aos 18 meses (BRENDEL et al., 2017). Apesar de o efeito da suplementação de ND sobre a captação de FDG cerebral não ter sido explorada, o que a literatura prévia aponta é que a testosterona induz aumento na captação de glicose cerebral em pacientes, independentemente do sexo (MILLER et al., 2004; ZITZMANN et al., 2001), o que replicamos nos camundongos adultos suplementados com ND.

Curiosamente, nossos dados apontam que a suplementação com ND nos camundongos envelhecidos não apresenta benefícios em relação à captação de FDG. Estudos em humanos indicam que terapia de reposição de testosterona (TRT) induz aumentos na captação de glicose de pacientes. Assim, as diferenças reportadas em nosso estudo em relação à mediação dos EAAs na captação de FDG e no hipometabolismo poderiam indicar diferentes respostas metabólicas do cérebro humano e de roedores em envelhecimento. Além disso, já foi proposto que os efeitos cerebrais da testosterona na captação de FDG estão relacionadas, de fato, com seus metabólitos com afinidade pelo receptor estrogênico. Isto se dá visto que, o efeito aparente da testosterona sobre a captação de FDG é atenuado com a administração de um inibidor da ação da aromatase (CHERRIER et al., 2005). Desta forma, nosso

estudo pode ser influenciado pela menor afinidade de ND pela enzima aromatase, assim exibindo menor sinalização estrogênica quando comparada com a testosterona (CLARK; HENDERSON, 2003).

O impacto do envelhecimento sobre a captação cerebral de glicose (FDG-PET) já foi consistentemente descrito em humanos, reforçando conceitos bastante explorados como, por exemplo, resistência cerebral à insulina (HAAS et al., 2016) e hipometabolismo cerebral associado ao envelhecimento. Entretanto, há evidências de que o modelo de envelhecimento em camundongos não é capaz de replicar o hipometabolismo cerebral relatado em humanos (BRENDDEL et al., 2017; WALDRON et al., 2017). Neste sentido, um aspecto que deve ser levado em consideração é a interação dos diferentes tipos celulares cerebrais no metabolismo de glicose. De acordo com isso Zimmer et al 2017 propõem que captação de FDG ocorre não apenas pelos neurônios, mas também pelas células gliais o que influenciaria a aquisição de imagem pelo microPET scan (ZIMMER et al., 2017). Entretanto, não pudemos distinguir o sinal do microPET entre neurônios e astrócitos, ou até mesmo micróglia. Sabe-se que o envelhecimento, em resposta a diferenças na demanda energética, imposta pelo estado neuroinflamatório poderia tanto exacerbar quanto inibir a captação do FDG.

Entretanto, mais estudos são necessários para averiguar a capacidade translacional dos resultados obtidos por microPET-FDG em camundongos envelhecidos e humanos, em particular que busquem a melhor compreensão das potenciais discrepâncias metabólicas que geram baixa validade de face observada, bem como que enderecem outros parâmetros que possam

embasar novamente a validade de predictabilidade do modelo para uso em pesquisa pré-clínica (BELZUNG; LEMOINE, 2011).

Levando em conta estas considerações, podemos assumir que a suplementação com ND não beneficia a captação de FDG em cérebros de camundongos envelhecidos. Visto que a captação de glicose é o passo inicial para múltiplas vias de biossíntese e degradação, por exemplo síntese de lipídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos, um aumento na captação de glicose nem sempre necessariamente implica em um aumento no metabolismo energético (GJEDDE, 1987; MARINI et al., 2016). A captação de ^{18}F FDG leva à formação de ^{18}F FDG-6-fosfato, pela hexocinase, o qual diferentemente do seu análogo glicose-6-fosfato, é um falso substrato para as enzimas subsequentes (SOKOLOFF et al., 1977).

Através da análise por respirometria em alta resolução em sinaptossomas pudemos obter uma perspectiva mais ampla da maquinaria bioenergética, para além da atividade da hexocinase. Observamos que a suplementação com ND aumentou o consumo de oxigênio (OCR) relacionado à disponibilidade de substratos endógenos, que é coincidente com o aumento na captação de FDG já citada anteriormente. Observou-se também que a nandrolona levou a um aumento na razão de controle respiratório (RCR) apenas dos animais envelhecidos suplementados com nandrolona. RCR indica a capacidade da fosforilação oxidativa (OXPHOS) induzir o aumento do consumo de oxigênio. Desta forma, pode-se dizer que quanto maior o valor de RCR, maior é a capacidade da cadeia respiratória consumir oxigênio em resposta à demanda energética, indicando indiretamente a eficiência de acoplamento do sistema de transporte de elétrons à OXPHOS (CHANCE;

WILLIAMS, 1955). Tal resultado já foi demonstrado anteriormente (DARNOLD; VORBECK; MARTIN, 1990; GILMER et al., 2010; MENG et al., 2007; WEINDRUCH et al., 1980). Entretanto ainda existem algumas controvérsias sobre este tema, visto que outros estudos relataram reduções em RCR e capacidade máxima de respiração acoplada à produção de ATP (NAVARRO et al., 2005, 2008, PETROSILLO et al., 2008a, 2008b). Recentemente, um trabalho publicado por Holloway *et al.* sugeriu que as alterações bioenergéticas do tecido muscular esquelético de homens idosos não se traduzem diretamente em alterações de RCR. Contudo, é observado uma baixa sensibilidade da ATP sintase mitocondrial ao ADP gerada pelo envelhecimento (HOLLOWAY et al., 2018). É importante pontuar que o envelhecimento não afeta de forma igual todos os tecidos. Por exemplo, já foi relatada diferenças do envelhecimento sobre a bioenergética de fibras musculares de composição diferentes, onde um metabolismo mais oxidativo aparentemente apresentou um efeito protetor, levando a menor disfunção (AMARA et al., 2007). Portanto, deve-se levar em consideração a resposta tecido-específica das mitocôndrias, que no nosso trabalho foi analisada em preparações de sinaptossomas submetidos a concentrações saturantes de ADP. Por outro lado, nossos resultados sobre as alterações do RCR no envelhecimento estão concordantes com trabalhos já publicados e evidenciam a necessidade de se explorar o envelhecimento num contexto tecido dependente, levando em conta as respostas mitocondriais específicas.

A redução da sensibilidade ao ADP, juntamente com uma inibição da adenilato cinase, já descrita (KACZOR et al., 2006), levaria mecanisticamente a menores níveis de ATP/AMP. A razão AMP/ATP citosólica é um conhecido

regulador da atividade da enzima AMPK (HABETS et al., 2009; WOODS et al., 2003). Mostramos que camundongos envelhecidos (18m / VEH) apresentam uma diminuição da ativação de AMPK no hipotálamo. Apesar de não avaliarmos aqui especificamente a insensibilidade ao ADP, ela poderia mecanisticamente explicar a redução na ativação de AMPK mesmo na ausência de alterações bioenergéticas, tal como proposto por Holloway *et al.* Interessante é que a administração de ND nos animais velhos (18m / ND) levou a um aumento na ativação de AMPK hipotalâmica (pAMPK_{T172}/AMPK), bem como a um aumento em RCR, o que já havia sido relatado na próstata e em tecido muscular, mas não ainda no cérebro (KHAN; FRIGO, 2017; WHITE et al., 2013b).

É reconhecido que a ativação da AMPK no hipotálamo impacta nos padrões alimentares. Há por exemplo indícios que o efeito anorexigênico da leptina envolve a inibição de AMPK no hipotálamo. Há também trabalhos mostrando que a ativação de AMPK dos neurônios pré-sinápticos participa da resposta orquestrada dos neurônios AgrP/NPY e POMC para a regulação do comportamento alimentar (ANDERSSON et al., 2004; KUBOTA et al., 2007; LÓPEZ et al., 2010, 2016; MINOKOSHI et al., 2004). Apesar da ativação de AMPK no hipotálamo ocorrer de forma diferente que outros tecidos e desencadear respostas distintas no padrão alimentar, aqui mostramos uma diminuição global da ativação de AMPK no hipotálamo, a qual é atenuada pela ND no envelhecimento. Apesar que a inibição de AMPK impacta o padrão alimentar dos camundongos envelhecidos levando a efeitos anorexigênicos similares aos induzidos pela leptina, tal parâmetro não foi avaliado neste

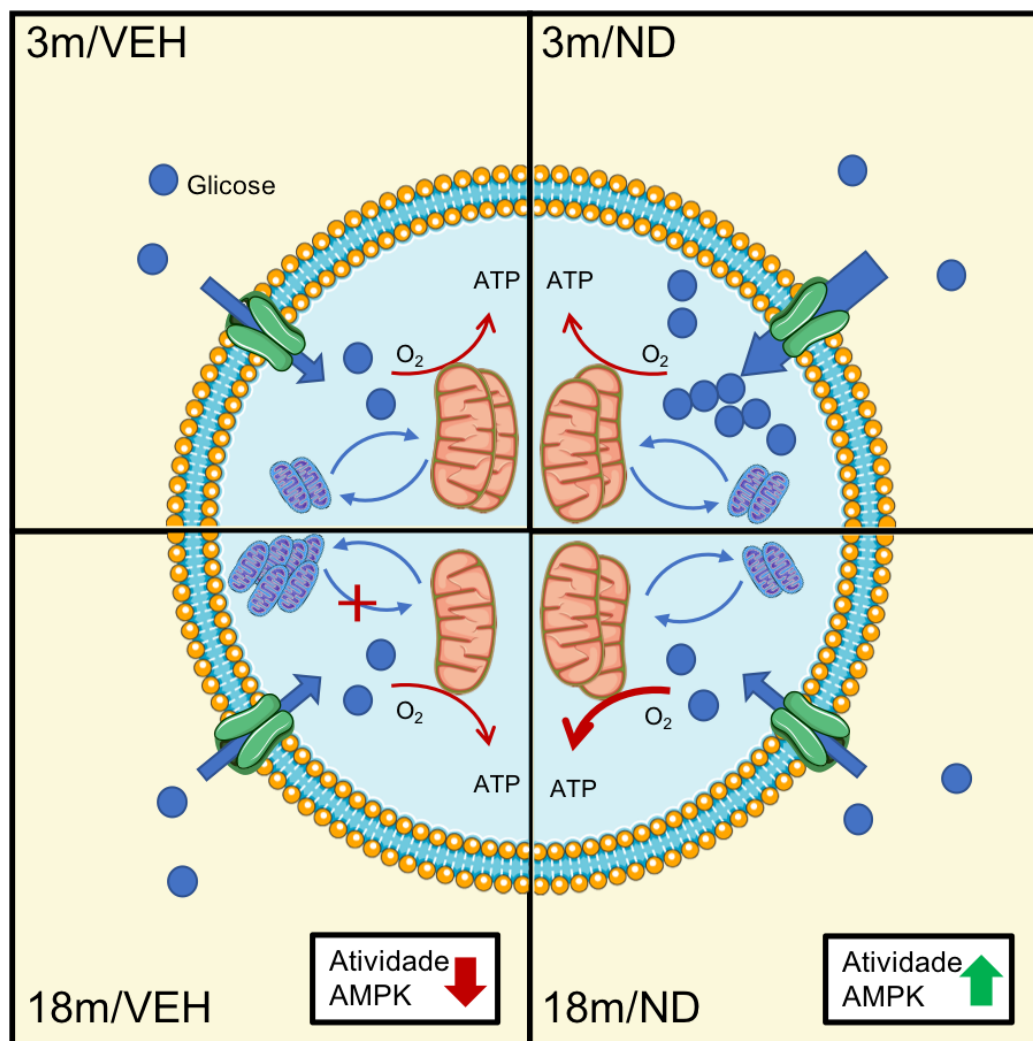
trabalho, bem como seria importante avaliar em qual contexto neuronal esta inibição de AMPK ocorre.

A proteína AMPK não está associada apenas à regulação do metabolismo energético, mas também à integração da mesma aos mecanismos de reciclagem celular. Um exemplo disso, é a capacidade da AMPK aumentar o fluxo autofágico (KIM et al., 2011). Neste trabalho observamos que concomitantemente à redução da ativação de AMPK hipotalâmica, o envelhecimento induz um acúmulo de LC3-II, o que indica potencial disfunção no fluxo autofágico e acúmulo de autofagossomos, que já se apresenta estabelecido na literatura (GALLUZZI et al., 2016; GARCÍA-PRAT et al., 2016; SCHAEFFER et al., 2012); A suplementação com ND teve o potencial de atenuar o acúmulo de autofagossomos. Esta melhora no fluxo autofágico poderia aumentar à reciclagem de mitocôndrias disfuncionais, o que culminaria na presença de organelas com maior eficiência no consumo de oxigênio acoplado à produção de ATP, exemplificado por aumento de RCR sem implicar aumentos na captação de FDG (HILL et al., 2012; SIN et al., 2016).

Buscamos então, investigar se os mecanismos de indução da autofagia pela suplementação com nandrolona se davam por vias alternativas de regulação. Mostramos que os níveis de Beclin-1 e BCL-2 se encontram aumentadas no hipotálamo dos camundongos envelhecidos comparados com os animais adultos controle, o que não é alterado pela suplementação com ND. Diferente da redução observada em humanos, os aumentos nos níveis de Beclin-1 poderiam ser explicado pelo acúmulo de beclin-1 disfuncional, a qual não apresenta papel regulatório. Por outro lado, poderia também ser explicada

pelo aumento concomitante de BCL-2, contrabalanceando este aumento de Beclin-1. Observamos que a razão dos imunocorrelatos Beclin-1/BCL-2 não foi alterado pelo envelhecimento possibilitando o declínio na autofagia reportado. O aumento do fluxo autofágico pela suplementação de ND não ocorre de forma simultânea à alterações nos imunocorrelatos de Beclin-1 e BCL-2, nem da razão dos imunocorrelatos em relação aos camundongos adultos controle, sugerindo que ND induz autofagia em camundongos envelhecidos por um mecanismo que independe de Beclin-1.

RESUMO GRÁFICO



Aqui mostramos que os camundongos envelhecidos não apresentam alterações significativas na captação de FDG cerebral, enquanto que a suplementação com ND apresenta benefícios à captação de FDG apenas nos animais adultos. Nossos resultados sugerem também que a suplementação com ND apresenta benefícios à função mitocondrial apenas nos camundongos envelhecidos. Observamos que os animais envelhecidos apresentam menor ativação de AMPK hipotalâmica, o que foi atenuado pela suplementação com ND. A indução de AMPK hipotalâmica pela suplementação com ND ocorre de forma concomitante com a redução do acúmulo de autofagossomos nos animais envelhecidos, e este mecanismo ocorre de forma independente de Beclin-1.

CONCLUSÃO

Os dados aqui obtidos proporcionam evidências que a captação de glicose e metabolismo mitocondrial estão normais em cérebro de camundongos envelhecidos, enquanto que a ativação de AMPK e o fluxo autofágico no hipotálamo estão prejudicados. A suplementação com ND melhora a eficiência bioenergética, a sinalização de AMPK e o fluxo autofágico nos camundongos envelhecidos. Assim, os benefícios da suplementação com ND para a produção energética e fluxo autofágico no envelhecimento de camundongos parece ser mediada por reprogramação da ativação de AMPK.

Referências:

AMARA, C. E. et al. Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 1057–62, 16 jan. 2007.

ANDERSSON, U. et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12005–8, 26 mar. 2004.

BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 1, n. 1, p. 9, 7 nov. 2011.

BRENDEL, M. et al. Time Courses of Cortical Glucose Metabolism and Microglial Activity Across the Life-Span of Wild-Type Mice: A PET Study. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 0, p. jnumed.117.195107, 2017.

BROWN-SÉQUARD, C. Du rôle physiologique et thérapeutique d'un suc extrait de testicules d'animaux d'après nombre des faits observés chez l'homme. **Archives de Physiologie Normale et Pathologique**, v. 1, p. 739–746, 1899.

CARLING, D. et al. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 8, p. 512–518, jul. 2011.

CASTILLO, K. et al. Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. v. 8627, n. July 2017, 2013.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative

phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. **The Journal of biological chemistry**, v. 217, n. 1, p. 383–93, nov. 1955.

CHERRIER, M. M. et al. The role of aromatization in testosterone supplementation: Effects on cognition in older men. **Neurology**, v. 64, n. 2, p. 290–296, 25 jan. 2005.

CLARK, A. S.; HENDERSON, L. P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 27, n. 5, p. 413–36, ago. 2003.

DARNOLD, J. R.; VORBECK, M. L.; MARTIN, A. P. Effect of aging on the oxidative phosphorylation pathway. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 53, n. 2, p. 157–167, 9 abr. 1990.

DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 169–85, maio 2004.

DE MAGALHÃES, J. P.; STEVENS, M.; THORNTON, D. The Business of Anti-Aging Science. **Trends in biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1062–1073, 1 nov. 2017.

DERETIC, V. Autophagy in innate and adaptive immunity. **Trends in immunology**, v. 26, n. 10, p. 523–8, out. 2005.

DONG, W. et al. Autophagy involving age-related cognitive behavior and hippocampus injury is modulated by different caloric intake in mice. v. 8, n. 7, p. 11843–11853, 2015.

DRIGEARD DESGARNIER, M.-C.; ROCHETTE, P. J. Enhancement of UVB-induced DNA damage repair after a chronic low-dose UVB pre-stimulation. **DNA Repair**, v. 63, p. 56–62, mar. 2018.

ESTRADA, M. et al. Testosterone Stimulates Intracellular Calcium Release

and Mitogen-Activated Protein Kinases Via a G Protein-Coupled Receptor in Skeletal Muscle Cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3586–3597, 1 ago. 2003.

FERRUCCI, L.; GIALLAURIA, F.; GURALNIK, J. M. **Epidemiology of AgingRadiologic clinics of North America**, jul. 2008.

GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 7, p. 856–880, 1 abr. 2015.

GALLUZZI, L. et al. Autophagy in acute brain injury. **Nature Publishing Group**, v. 17, n. 8, p. 467–484, 2016.

GANLEY, I. G. et al. ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy □. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12297–12305, 2009.

GARCÍA-PRAT, L. et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 37–42, 2016.

GILMER, L. K. et al. Age-related Changes in Mitochondrial Respiration and Oxidative Damage in the Cerebral Cortex of the Fischer 344 Rat. **Mech Ageing Dev**, v. 131, n. 2, p. 133–143, 2010.

GJEDDE, A. Does deoxyglucose uptake in the brain reflect energy metabolism? **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 12, p. 1853–1861, 15 jun. 1987.

GOLDBERG, J. et al. The mitochondrial ATP synthase is a shared drug target for aging and dementia. **Aging Cell**, v. 17, n. 2, p. e12715, abr. 2018.

HAAS, C. B. et al. Brain Insulin Administration Triggers Distinct Cognitive and Neurotrophic Responses in Young and Aged Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 9, p. 5807–5817, 26 nov. 2016.

HABETS, D. D. J. et al. Crucial role for LKB1 to AMPK α 2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1791, n. 3, p. 212–9, mar. 2009.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 2, p. 175–200, 1 abr. 2002.

HILL, B. G. et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. **Biological chemistry**, v. 393, n. 12, p. 1485–1512, dez. 2012.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p. 1475–1485, 8 out. 2009.

HOLLOWAY, G. P. et al. Age-Associated Impairments in Mitochondrial ADP Sensitivity Contribute to Redox Stress in Senescent Human Skeletal Muscle. **Cell Reports**, v. 22, n. 11, p. 2837–2848, 13 mar. 2018.

HUANG, K.; FINGAR, D. C. Growing knowledge of the mTOR signaling network. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 36, p. 79–90, dez. 2014.

JANOWSKY, J. S.; OVIATT, S. K.; ORWOLL, E. S. Testosterone Influences Spatial Cognition in Older Men. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, n. 2, p. 325–332, 1994.

JASUJA, G. K. et al. Use of testosterone in men infected with human immunodeficiency virus in the veterans healthcare system. **AIDS Care**, p. 1–8, 19 mar. 2018.

JOHNSON, S. C.; RABINOVITCH, P. S.; KAEBERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature**, v. 493, n. 7432, p.

338–45, 17 jan. 2013.

KACZOR, J. J. et al. The effect of aging on anaerobic and aerobic enzyme activities in human skeletal muscle. **The journals of gerontology**, v. 61, n. 4, p. 339–44, abr. 2006.

KAKIMOTO, A. et al. Age-Related Sex-Specific Changes in Brain Metabolism and Morphology. p. 221–226, 2016.

KANG, R. et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 4, p. 571–580, 2011.

KENYON, C. The Plasticity of Aging : Insights from Long-Lived Mutants. v. 120, p. 449–460, 2005.

KHAN, A. S.; FRIGO, D. E. A spatiotemporal hypothesis for the regulation, role and targeting of AMPK in prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n. 3, p. 164–180, 1 mar. 2017.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 502–21, jun. 2008.

KIM, J. et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 2, p. 132–141, 2011.

KOMATSU, M. et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature**, v. 441, n. 7095, p. 880–4, 15 jun. 2006.

KONISHI, A. et al. Involvement of Beclin 1 in Engulfment of Apoptotic Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 17, p. 13919–13929, 2012.

KUBOTA, N. et al. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 1, p. 55–68, jul. 2007.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709–715, 22 abr. 1993.

LOPEZ-OTIN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, jun. 2013.

LÓPEZ, M. et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. **Nature medicine**, v. 16, n. 9, p. 1001–8, 29 set. 2010.

LÓPEZ, M. et al. Hypothalamic AMPK : a canonical regulator of whole-body energy balance. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 7, p. 421–432, 2016.

MARINI, C. et al. Discovery of a novel glucose metabolism in cancer: The role of endoplasmic reticulum beyond glycolysis and pentose phosphate shunt. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25092, 28 jul. 2016.

MEDINA, D. L. et al. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. **Nature cell biology**, v. 17, n. 3, p. 288–99, 1 mar. 2015.

MENG, Q. et al. Age-related changes in mitochondrial function and antioxidative enzyme activity in fischer 344 rats. **Mechanisms of ageing and development**, v. 128, n. 3, p. 286–92, mar. 2007.

MILLER, K. K. et al. Testosterone administration attenuates regional brain hypometabolism in women with anorexia nervosa. v. 132, p. 197–207, 2004.

MINOKOSHI, Y. et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 569–574, 1 abr. 2004.

MITCHELL, R. et al. Age related changes in the pituitary-testicular axis in normal men; lower serum testosterone results from decreased bioactive LH

drive. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 42, n. 5, p. 501–507, 1995.

MIZUSHIMA, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 132–139, abr. 2010.

MØLLER, P. et al. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 762, p. 133–166, 1 out. 2014.

MORAIS, G. et al. Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol**, v. 19, n. 3, p. 507–519, 2016.

MORLEY, J. F.; MORIMOTO, R. I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 2, p. 657–64, 2 fev. 2004.

MOSKALEV, A. A. et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 661–684, 1 mar. 2013.

NAVARRO, A. et al. Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 289, n. 5, p. R1392-9, nov. 2005.

NAVARRO, A. et al. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 294, n. 2, p. R501-9, fev. 2008.

NODA, N. N.; INAGAKI, F. Mechanisms of Autophagy. **Annual review of biophysics**, v. 44, n. 1, p. 101–22, 22 jun. 2015.

PATTINGRE, S. et al. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent

Autophagy at Dallas. v. 122, p. 927–939, 2005.

PETROSILLO, G. et al. Melatonin prevents age-related mitochondrial dysfunction in rat brain via cardiolipin protection. **Rejuvenation research**, v. 11, n. 5, p. 935–43, out. 2008a.

PETROSILLO, G. et al. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. **Neurochemistry international**, v. 53, n. 5, p. 126–31, nov. 2008b.

ROBERTS, P. et al. Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 1, p. 129–141, 1 jan. 2003.

ROCZNIAK-FERGUSON, A. et al. The Transcription Factor TFEB Links mTORC1 Signaling to Transcriptional Control of Lysosome Homeostasis. **Science Signaling**, v. 5, n. 228, p. ra42-ra42, 12 jun. 2012.

RYAN, K. J. Biological aromatization of steroids. **The Journal of biological chemistry**, v. 234, n. 2, p. 268–72, fev. 1959.

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. **Ageing Research Reviews**, v. 11, n. 2, p. 230–241, 2012.

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K.; KAUPPINEN, A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 2, p. 520–534, mar. 2013.

SARKAR, S. et al. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 46–56, 18 jan.

2009.

SCHAEFFER, V. et al. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. **Brain**, p. 2169–2177, 2012.

SERRA, C. et al. The Effects of Testosterone Deprivation and Supplementation on Proteasomal and Autophagy Activity in the Skeletal Muscle of the Male Mouse: Differential Effects on High-Androgen Responder and Low-Androgen Responder Muscle Groups. **Endocrinology**, v. 154, n. 12, p. 4594–4606, dez. 2013.

SIN, J. et al. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. **Autophagy**, v. 12, n. 2, p. 369–80, 2016.

SOKOLOFF, L. et al. THE [¹⁴ C]DEOXYGLUCOSE METHOD FOR THE MEASUREMENT OF LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION: THEORY, PROCEDURE, AND NORMAL VALUES IN THE CONSCIOUS AND ANESTHETIZED ALBINO RAT. **Journal of Neurochemistry**, v. 28, n. 5, p. 897–916, 1 maio 1977.

STAMBLER, I. The unexpected outcomes of anti-aging, rejuvenation, and life extension studies: an origin of modern therapies. **Rejuvenation research**, v. 17, n. 3, p. 297–305, 2014.

SUZUKI, K. et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 5971–5981, 1 nov. 2001.

TAYLOR, R. C.; DILLIN, A. Aging as an Event of Proteostasis Collapse. v. 1, p. 1–17, 2011.

TERMAN, A. Lipofuscin : Mechanisms of formation and increase with age. n. 89, 1998.

UM, S. H. et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 200–205, 11 set. 2004.

VALVERDE, M. A.; PARKER, M. G. Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 172–173, abr. 2002.

WALDRON, A.-M. et al. Longitudinal Characterization of [18F]-FDG and [18F]-AV45 Uptake in the Double Transgenic TASTPM Mouse Model. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 55, n. 4, p. 1537–1548, 2017.

WEICHHART, T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 64, n. 2, p. 127–134, 2018.

WEINDRUCH, R. H. et al. Modification of mitochondrial respiration by aging and dietary restriction. **Mechanisms of ageing and development**, v. 12, n. 4, p. 375–92, abr. 1980.

WHITE, J. P. et al. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 365, n. 2, p. 174–186, 2013a.

WHITE, J. P. et al. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 365, n. 2, p. 174–186, 2013b.

WHO. **Active Ageing: A Policy Framework** World Health Organization. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/67215>>.

WOODS, A. et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. **Current biology : CB**, v. 13, n. 22, p. 2004–8, 11 nov. 2003.

WOODS, A. et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-β acts

upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. **Cell Metabolism**, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2005.

YANG, F. et al. mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 82–90, 2014.

YANG, S.-B. et al. Rapamycin Ameliorates Age-Dependent Obesity Associated with Increased mTOR Signaling in Hypothalamic POMC Neurons. **Neuron**, v. 75, n. 3, p. 425–436, 9 ago. 2012.

YORIMITSU, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. **Cell death and differentiation**, v. 12 Suppl 2, p. 1542–52, nov. 2005.

ZEROVNIK, E. Protein conformational pathology in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases; new targets for therapy. **Current Alzheimer research**, v. 7, n. 1, p. 74–83, fev. 2010.

ZIMMER, E. R. et al. [18F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 393–395, 30 mar. 2017.

ZITZMANN, M. et al. Changes in cerebral glucose metabolism and visuospatial capability in hypogonadal males under testosterone substitution therapy. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 109, n. 5, p. 302–304, 31 dez. 2001.