



FACULDADE DE FARMÁCIA

DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Modulação do fluxo autofágico pelo decanoato de nandrolona em hipotálamo de camundongos envelhecidos

NATHAN RYZEWSKI STROGULSKI

PORTO ALEGRE, 28 DE NOVEMBRO DE 2016



FACULDADE DE FARMÁCIA

DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Modulação do fluxo autofágico pelo decanoato de nandrolona em hipotálamo de camundongos envelhecidos

Aluno: NATHAN RYZEWSKI STROGULSKI

Orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

PORTO ALEGRE, 28 DE NOVEMBRO DE 2016

GLOSSÁRIO:

LC3: *Light Chain 3*

AMPK: *AMP-activated Protein Kinase*

BCL-2: *B-cell lymphoma 2*

AKT: *Protein kinase B*

FOXO: *Forkhead Box O transcription factors*

PI3K: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

mTOR: *Mechanistic Target of Rapamycin*

ULK-1: *unc-51 Like Kinase*

EAA's: Esteroides Anabólicos Androgênicos

ND: Decanoato de Nandrolona

Este trabalho foi realizado conforme as especificações de estrutura da revista "*Clinical and Biomedical Research*" e adequações serão executadas após revisão da banca.

1 **RESUMO:**

2 **INTRODUÇÃO:** O envelhecimento recente da população mundial têm
3 apresentado à ciência e medicina moderna novos desafios e questionamentos quanto aos

1 mecanismos neurobiológicos do envelhecimento. O envelhecimento fisiológico é
2 responsável por um grupo de características clínicas marcantes, tais como declínio do
3 metabolismo energético, perda da proteostase gerando acúmulo protéico, bem como,
4 um significativo desbalanço na regulação hormonal androgênica. Atribui-se ao
5 desbalanço da homeostase protéica disfunções no sistema autofágico. Neste contexto
6 destaca-se a importância do tecido hipotalâmico como importante alvo dos hormônios
7 gonadais, bem como regulador do metabolismo energético global. Baseado nestas
8 premissas, a administração de hormônios androgênicos esteroides exógenos têm sido
9 proposta desde o século passado, visando reverter sintomas clínicos característicos do
10 envelhecimento. Entretanto, a modulação da maquinaria autofágica pelos hormônios
11 esteroides e o seu impacto no balanço energético ainda não foram definidos.
12 **MÉTODOS:** Neste trabalho administramos decanoato de nandrolona (ND, 15 mg/Kg,
13 s.c.) por 15 dias em camundongos CF1 machos de 3 meses 18 meses. Após o sacrifício,
14 foram analisadas proteínas da maquinaria autofágica no hipotálamo. **RESULTADOS:**
15 Os animais envelhecidos apresentam um acúmulo de autofagossomos evidenciado pela
16 redução na razão LC3II/LC3I e o tratamento com ND reverteu este perfil. Observamos
17 um aumento no imunoconteúdo de Beclin-1 nos animais envelhecidos
18 independentemente de ND. Finalmente, o tratamento com ND aumentou a ativação da
19 via AMPK. **CONCLUSÃO:** Este estudo demonstra um acúmulo de autofagossomos
20 associado ao envelhecimento e o tratamento com ND ativa o fluxo autofágico de
21 maneira AMPK-dependente.

22

23 **ABSTRACT**

1 **INTRODUCTION:** Populational ageing has presented modern science and medicine
2 new challenges and questions about the neurobiological mechanisms of aging.
3 Physiological aging is responsible for a group of marked clinical features, such as a
4 decline in energy metabolism, loss of proteostase, generating protein accumulation, as
5 well as a significant imbalance in androgen hormonal regulation. It is attributed a
6 dysfunction in the autophagic system the imbalance of protein homeostasis. In this
7 context, the importance of hypothalamic tissue as an important target of gonadal
8 hormones as well as regulator of global energy metabolism is highlighted. Based on
9 these premises, the administration of exogenous steroid androgenic hormones has been
10 proposed since the last century, aiming to revert clinical symptoms characteristic of
11 aging. However, the modulation of autophagic machinery by steroid hormones and its
12 impact on energy balance have not yet been defined. **METHODS:** In this work we
13 administered nandrolone decanoate (ND, 15 mg / kg, s.c.) for 15 days in male CF1 mice
14 aged 18 months and 3 months. After the euthanasia, proteins from the autophagic
15 machinery were analyzed in the hypothalamus. **RESULTS:** Aged animals presented an
16 accumulation of autophagosomes evidenced by the reduction in LC3II / LC3I ratio, and
17 treatment with ND reversed this profile. We observed an increase in the immunocontent
18 of Beclin-1 in aged animals independently of ND. Finally, treatment with ND increased
19 the activation of the AMPK pathway. **CONCLUSION:** This study demonstrates an
20 accumulation of autophagosomes associated with aging and treatment with ND
21 activates autophagic flow in an AMPK-dependent manner

22 Keywords: Autophagy, Ageing, AMPK, Beclin-1, Anabolic Androgen Steroid.

23

24 **INTRODUÇÃO**

1 O envelhecimento da população mundial é um fenômeno associado, em parte, a
2 reduções nos índices de mortalidade devido ao acesso a tecnologias que melhoram a
3 qualidade de vida (1). No entanto, novos desafios científicos surgem, abrindo assim,
4 cada vez mais espaço para questões relacionadas aos mecanismos envolvidos na
5 biologia do envelhecimento. Sabe-se que, durante o processo de envelhecimento ocorre
6 um declínio geral das funções celulares, atribuído parcialmente ao acúmulo de
7 macromoléculas e organelas danificadas que não foram eliminadas pela célula. O
8 acúmulo exacerbado de proteínas é um achado histopatológico comum em doenças
9 relacionadas ao envelhecimento; Principalmente doenças neurodegenerativas como as
10 doenças de Alzheimer e Parkinson (2). No ambiente celular, o principal mecanismo
11 responsável por realizar a eliminação de macromoléculas e organelas danificadas e
12 impedir seu efeitos tóxicos é denominado de autofagia, um processo fisiológico que
13 contribui para a sobrevivência celular.

14 Apesar da definição sugerir um processo único, a autofagia se refere à uma
15 complexidade de mecanismos celulares e moleculares distintos, como segue: a)
16 Macroautofagia, o processo mais estudado e, normalmente, amplamente relacionado
17 com a degradação de organelas e macromoléculas disfuncionais. Tal processo envolve a
18 depuração de conteúdos intracelulares utilizando uma estrutura vesicular especializada
19 denominada autofagossomo, a qual transporta o material a ser degradado até o
20 lisossomo; b) Microautofagia, o processo onde a depuração se dá via uma invaginação
21 do lisossomo, permitindo a entrada direta do material a ser degradado; e c) Autofagia
22 mediada por chaperona, onde proteínas denominadas de chaperonas carregam o material
23 a ser degradado para o lisossomo (3). A macroautofagia é regulada por diferentes vias
24 de sinalização intracelulares (4). Entre as vias majoritárias de regulação está a via

1 regulada pela proteína denominada mTOR (do inglês *mechanistic Target of*
2 *Rapamycin*) (5).

3 A mTOR é um importante supressor de mecanismos autofágicos, atuando na
4 fosforilação direta de ULK1 no sítio **S757**(6,7), uma das proteínas responsáveis pela
5 iniciação do processo autofágico. A via regulada pelo complexo mTOR é responsável
6 pela integração de sinalizações ligadas a fatores de crescimento, aporte de substratos e à
7 demanda energética. Por ser um complexo de regulação negativa de autofagia, a
8 inibição da mTOR causa a indução da autofagia. Dentre as proteínas relevantes da via
9 de regulação da mTOR destacam-se as proteínas do eixo PI3K-AKT (8). Além do seu
10 papel na regulação da apoptose, AKT é um importante regulador de mTOR, sendo
11 assim, responsável por inibir estímulos autofágicos (9). O papel de AKT na regulação
12 da autofagia porém não se restringe exclusivamente à via da mTOR; visto que, sua
13 sinalização também exerce efeitos sobre a regulação transcricional de proteínas FOXO
14 as quais medeiam a síntese de proteínas autofágicas, atuando assim como um
15 mecanismo mTOR-independente (10). Em contrapartida, a proteína AMPK atua como
16 reguladora negativa da via mTOR. O mecanismo via AMPK atua na ativação direta da
17 autofagia, bem como se atribui à AMPK a fosforilação direta e consequente inibição de
18 mTOR. Sendo assim a AMPK tem um caráter de indutor sinérgico de processos
19 autofágicos por vias mTOR dependentes e independentes (6). Dentre as diversas
20 proteínas autofágicas inseridas no contexto do envelhecimento destaca-se o papel da
21 Beclin-1; Responsável pelo controle da etapa de iniciação do fluxo autofágico e
22 indispensável para a integração dos estímulos apoptóticos, autofágicos e inflamatórios
23 intracelulares. Sua atividade é regulada pela proteína anti-apoptótica e anti-autofágica
24 BCL-2. A Beclin-1 é uma plataforma protéica capaz de interagir com proteínas de
25 membrana específicas, de forma a controlar os mecanismos neurobiológicos

1 responsáveis pela formação de vesículas dentro da célula; regulando assim, tanto
2 processos autofágicos e endocíticos.

3 Estudos anteriores com modelos *in vivo* e *in vitro* já evidenciaram diminuição
4 dos níveis de autofagia com o envelhecimento. Desta maneira a utilização de
5 estratégias para indução de autofagia poderia prevenir a diminuição ou exaustão da
6 atividade da maquinaria autofágica e consequentes desfechos positivos para o
7 envelhecimento. Realmente a indução de autofagia utilizando rapamicina, ou dietas de
8 restrição calórica em modelos de envelhecimento induzem um aumento na sobrevivência
9 (11).

10 Neste contexto, a reposição hormonal tem sido proposta desde o século 19 como
11 uma estratégia que visa diminuir as perdas celulares e funcionais associadas ao
12 envelhecimento (12). Estudos têm mostrado uma concomitante diminuição da
13 sinalização de hormônios anabólicos, deficiência na homeostase metabólica e protéica
14 no cérebro. Coincidentemente o desbalanço hormonal anabólico é intimamente
15 relacionado à uma disfunção na via de sinalização hipotalâmica-gonadal (13). É
16 atribuído às funções fisiológicas do hipotálamo a regulação do balanço energético
17 global, o qual sofre um característico declínio como consequência do envelhecimento.
18 O impacto destas alterações na fisiologia do envelhecimento associadas ao declínio
19 hormonal têm sido a justificativa para farmacoterapias de reposição hormonal utilizando
20 estróides anabólicos androgênicos (EAA's)

21 Foi recentemente descrito que a administração do decanoato de nandrolona
22 (ND), um análogo sintético da testosterona, modula o eixo mTOR/AKT e aumenta a
23 atividade do sistema autofágico em músculo esquelético (14), (WHITE et al., 2013)
24 (13). Embora os anabólicos esteroides sejam uma classe de medicamentos aprovado

1 pela Agência de alimentos e medicamentos americana “FDA” e apresentem
2 propriedades terapêuticas reconhecidas há mais de 100 anos, o impacto da sua
3 suplementação sobre os mecanismos relacionados ao sistema autofágico no cérebro
4 envelhecido, especialmente no hipotálamo, ainda não estão bem elucidados e requerem
5 estudos complementares.

6 Baseado nestes pressupostos, o objetivo primário deste trabalho foi avaliar o
7 impacto da administração de ND sobre o fluxo autofágico, no hipotálamo de
8 camundongos envelhecidos.

9 **MATERIAIS E MÉTODOS:**

10 **Animais e tratamento:**

11 Foram utilizados camundongos machos CF1 com 3 e 18 meses de idade
12 provenientes do biotério central da UFRGS (CEUA:#31443). Os animais foram
13 transferidos para o local de experimentação, o biotério do Departamento de Bioquímica,
14 ICBS da UFRGS, onde foram mantidos em caixas-moradia (4 animais por caixa) com
15 água e ração padrão *ad libitum* e ciclo claro-escuro, com luzes acesas das 7h às 19h.
16 Após 2 semanas de habituação os animais foram submetidos aos procedimentos
17 experimentais, sob ração padronizada do biotério e água *ad libitum*. Os animais foram
18 submetidos à uma administração diária de ND (15mg/kg) ou veículo oleoso, por via
19 subcutânea no turno da manhã durante quinze dias, de forma a mimetizar o ciclo de
20 tratamento realizado por atletas(16). Após a conclusão do tratamento farmacológico os
21 animais foram submetidos a anestesia inalatória, em câmara de isoflurano e oxigênio
22 para posterior decapitação, seguida da remoção do encéfalo para dissecação de
23 estruturas e as análises neuroquímicas.

24

1 **Avaliação Neuroquímica**

2 Amostras de hipotálamo foram homogeneizadas em tampão PIK (150mM NaCl,
3 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10 % glicerol, 1 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ e 1 % NP-40)
4 juntamente com inibidores de proteases, normalizadas utilizando o ensaio do ácido
5 bicinconínico. As amostras homogeneizadas foram submetidas à eletroforese SDS-
6 PAGE em gel de bis-acrilamida de 12 % ou 14 % para melhor resolução de proteínas de
7 baixo peso molecular. Foram analisados em 25µg de amostra, o imunoconteúdo das
8 proteínas LC3A/B (Cell Signaling 1:1000); Beclin-1 (Cell Signaling 1:1000); BCL-2
9 (Cell Signaling 1:1000); AMPKα2 (Cell Signaling); pAMPK(t172) (Cell Signaling
10 1:1000).

11 **Análise estatística**

12 Os resultados neuroquímicos foram analisados através de análise de variância
13 de duas vias (ANOVA) utilizando o pós-teste de Bonferroni. Quando aplicável utilizou-
14 se o teste d de Cohen para avaliar tamanho de efeito. Para $d > 0.8$ efeito grande, $d > 0.5$
15 médio e $d > 0.2$ pequeno. O cálculo do tamanho de efeito de Cohen é um importante
16 complemento aos testes de significância da hipótese nula como a ANOVA, uma vez que
17 permite a quantificação de uma potencial significância real de um efeito em uma
18 intervenção. Essa medida descreve de forma quantitativa os efeitos observados, isto é:
19 Resultados com efeito grande, entretanto não significantes, podem sugerir a pesquisas
20 futuras a necessidade de maior poder, enquanto efeitos pequenos, mas significantes
21 devido ao grande tamanho amostral, podem levar a uma supervalorização do efeito
22 observado. Os dados foram representados como média ± erro padrão (paramétricos),
23 considerando $P \leq 0,05$ como significância estatística. Valores nos gráficos são
24 representados por média e erro padrão da média(±SEM) .

1 **RESULTADOS:**

2 **Nandrolona reverte acúmulo de autofagossomos hipotalâmicos induzidos** 3 **por envelhecimento.**

4 O envelhecimento aumenta o imunoconteúdo de LC3II (Cohen's $d=1.547$),
5 quando comparado com os animais jovens. O tratamento com ND por 15 dias mostrou
6 uma tendência a aumentar LC3II quando comparado com o grupo jovem (Cohen's
7 $d=1.086$) (Fig.1,2).

8 A relação LC3II/LC3I, que indica a taxa de formação de autofagossomas,
9 diminuiu em animais envelhecidos em relação aos animais jovens (Cohen's $d=0.501$). A
10 ND reverte o aumento da relação LC3II/LC3I induzido pelo envelhecimento (Cohen's
11 $d=0.003$) (Fig.1,3).

12 **Nandrolona induz autofagia hipotalâmica por um mecanismo Beclin-1-** 13 **Independente.**

14 Observou-se um aumento significativo no imunoconteúdo de Beclin-1 nos
15 animais envelhecidos ($p<0.005$ ANOVA uma via, seguido de *post hoc* de Bonferroni),
16 independente de ND (Fig. 1,4). A proteína BCL-2; o principal regulador negativo do
17 complexo Beclin-1 apresentou elevação significativa associada ao envelhecimento
18 ($p<0.05$, ANOVA de uma via seguido de *post hoc* de Bonferroni), independentemente
19 do tratamento com ND (Fig.1,5) similarmente ao perfil já apresentado por Beclin-1.

20 **Tratamento com Nandrolona induz ativação de AMPK hipotalâmica.**

21 O imunoconteúdo de AMPK tende a aumentar nos animais envelhecidos quando
22 comparados ao grupo jovem, com resposta independente do tratamento (*cohen's d*=
23 1.462; *cohen's d*=1.236; grupo controle; grupo ND; respectivamente) (Fig.1,6).

1 A expressão da forma ativa de AMPK, pAMPK(t172) diminuiu no hipotálamo
2 dos animais envelhecidos controle, quando comparados ao grupo jovem (*cohen's*
3 $d=1.458$)(Fig.1,7). Em contrapartida, a ND aumentou a expressão pAMPK (t172) no
4 hipotálamo dos animais envelhecidos quando comparados ao grupo jovem (*Cohen's*
5 $d=0.154$) (Fig.1,7).

6 Avaliou-se a razão do imunoconteúdo de pAMPK(t172) e AMPK, como um
7 indicativo da ativação da via enzimática. Houve uma uma redução significativa na
8 ativação de AMPK dos animais envelhecidos controle quando comparados aos animais
9 jovens (ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de Bonferroni $p<0.001$), o qual é
10 revertido com o tratamento com ND (Fig.8).

11 **DISCUSSÃO:**

12 Neste estudo demonstramos um acúmulo de autofagossomos associado ao
13 envelhecimento, e a reversão deste efeito promovida pelo anabólico androgênico
14 esteroide ND, por um mecanismo que envolve ativação de AMPK.

15 O envelhecimento é uma consequência biológica natural, a qual desencadeia
16 declínio funcional sistêmico e central, com alterações características em processos
17 fisiológicos, tais como a perda da proteostase e o desbalanço do metabolismo
18 energético. acredita-se que tais alterações estejam associadas a danos progressivos na
19 maquinaria celular (17). Os diversos modelos de mutações genéticas que permitiram o
20 entendimento da plasticidade do envelhecimento envolvem mecanismos biológicos
21 conservados, os quais se mantêm desde organismos unicelulares como leveduras, a
22 organismos mais complexos como mamíferos. Tais processos biológicos normalmente
23 estão relacionados a vias de regulação do crescimento, metabolismo energético, como
24 por exemplo, as vias sinalizadas pela insulina ou pela proteína mTOR (18).

1 A perda da proteostase característica do envelhecimento é associada de forma
2 direta a um colapso nos sistemas de degradação protéica intracelular, os sistemas
3 ubiquitina-proteassoma e a macroautofagia (19). Este desbalanço na homeostase
4 protéica não apenas é associado ao envelhecimento fisiológico, como também é
5 característico de diversas proteínopatias relacionadas a doenças neurodegenerativas (2).

6 Alterações na proteostase e nas vias de regulação da autofagia estão intimamente
7 relacionadas ao aporte energético intracelular; visto que dentre os principais reguladores
8 de autofagia está a via de sinalização da insulina e a proteína AMPK. De igual forma,
9 atribui-se à sinalização de AMPK hipotalâmica a função de regulação do metabolismo
10 global, evidenciando assim, a importância da interação da autofagia no hipotálamo com
11 mecanismos de envelhecimento (20).

12 Desta forma investigamos inicialmente o desfecho primário do envelhecimento
13 sobre a autofagia no hipotálamo. É possível analisar o fluxo autofágico através da
14 quantificação da formação, maturação e depuração dos autofagossomos; Seu
15 mecanismo depende de modificações pós-traducionais da proteína LC3, a qual sofre
16 conversão da forma LC3I (presente no autofagossomo imaturo) por lipidação, para a
17 forma LC3II (presente no autofagossomo maduro).

18 Os valores obtidos pela análise de efeito de *cohen* sugerem uma diminuição na
19 razão LC3II/LC3I (*cohen's d=0,501*) dos animais envelhecidos em comparação aos
20 animais jovens (Fig. 3), sugerindo um efeito de acúmulo de autofagossomos relacionado
21 ao envelhecimento, o qual já havia sido descrito em outros tecidos (21). Acredita-se que
22 distúrbios de origem lisossomal, reduzem a taxa de depuração dos autofagossomas no
23 tecido envelhecido, causando acúmulo de proteínas, o que potencialmente pode implicar
24 em toxicidade e dano celular (22). Os resultados sugerem que o tratamento com ND é

1 capaz de reverter o efeito do envelhecimento sobre a razão LC3II/LC3I, o que pode
2 implicar em uma normalização nos níveis de depuração proteica, bem como,
3 potencialmente uma redução no acúmulo intracelular de proteínas com potencial tóxico.
4 Realmente, estudos anteriores, utilizando modelos de doença de Alzheimer e Parkinson
5 indicaram que a restauração na depuração de autofagossomas envolve a modulação da
6 razão LC3II/LC3I, e que sua normalização implicou na melhora da memória (23,24).

7 Um aspecto importante de nosso estudo foi analisar proteínas autofágicas que
8 estariam sendo reguladas pela ND. Neste contexto, analisamos o imunoconteúdo de
9 Beclin-1, uma das proteínas responsáveis pela iniciação do autofagossomo; a regulação
10 da via Beclin-1 envolve a interação com seu inibidor, BCL-2 (25).

11 Observamos que os animais envelhecidos tem um aumento na expressão de
12 Beclin-1 e BCL-2; enquanto a ND não modificou este perfil de expressão. Esses
13 resultados, associados à reversão no acúmulo de autofagossomos evidenciados pela
14 relação LC3II/LC3I nos animais idosos que receberam ND, sugerem um mecanismo de
15 indução da autofagia Beclin-independente pela ND.

16 Atualmente atribui-se à via de sinalização de AMPK no hipotálamo a função de
17 modulador do balanço energético (20). Além de modulador energético, tem sido
18 sugerido que a AMPK apresenta um papel regulador do processo autofágico. A
19 fosforilação de AMPK em t172 inibe mTOR, ativando o fluxo autofágico, bem como
20 induz autofagia através da ativação direta de proteínas como a ULK1 (6);

21 Evidenciou-se que envelhecimento aumentou os níveis de AMPK
22 independentemente de ND; Por outro lado, o envelhecimento diminui os níveis de
23 pAMPK(t172), enquanto o tratamento com ND reverte esse efeito. Tal perfil se reflete
24 no aumento da relação pAMPK/AMPK nos animais envelhecidos ND. Desta forma, o
25 efeito de ND sobre a autofagia hipotalâmica se dá por ativação de AMPK. Neste

1 contexto acreditamos que a redução na ativação de AMPK pode ser considerada uma
2 consequência do declínio natural do metabolismo energético associada ao
3 envelhecimento. De maneira global os resultados demonstram que a nandrolona induz a
4 atividade autofágica no hipotálamo de camundongos envelhecidos sugerindo um
5 mecanismo AMPK-dependente. Este mecanismo de regulação autofágica por EAA's já
6 foi proposto em tecido muscular esquelético, entretanto ainda não havia sido descrito
7 em tecido cerebral (15). Os resultados sugerem um potencial benefício da reposição
8 hormonal no envelhecimento, via ativação de mecanismos autofágicos AMPK-
9 dependentes, que potencialmente reduziriam a proteo-toxicidade e poderiam melhorar o
10 balanço energético.

11 As limitações deste trabalho estão relacionadas a uma população amostral
12 pequena. Acreditamos que mais estudos são necessários para que se possa elucidar de
13 forma mais completa o efeito dos EAA's sobre a maquinaria autofágica cerebral, como
14 seu efeito sobre a via mTOR, seu efeito sobre reguladores transcricionais como a
15 família FOXO, bem como o efeito do uso de EAA's sobre a bioenergética hipotalâmica.

16 Desta forma, este estudo demonstra um acúmulo de autofagossomas associado
17 ao envelhecimento e o tratamento com ND ativa mecanismos autofágicos de maneira
18 AMPK-dependente.

19

20

21

22

23

1 REFERÊNCIAS:

- 2 1. Lunenfeld B. Hormone replacement therapy in the aging male. *Aging Male*
3 [Internet]. Taylor & Francis; 1999 Jan 1;2(1):1–5. Available from:
4 <http://dx.doi.org/10.3109/13685539909003176>
- 5 2. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*.
6 2008;132(1):27–42.
- 7 3. Klionsky DJ, Cuervo AM, Dunn WA, Levine B, Van Der Klei I, Seglen PO.
8 How shall i eat thee? *Autophagy*. 2007;3(5):413–6.
- 9 4. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential
10 therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2012 Aug
11 31;11(9):709–30. Available from:
12 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0973688314002692>
- 13 5. Blommaert EFC, Luiken JJFP, Blommaert PJE, Van Woerkom GM, Meijer AJ.
14 Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated
15 rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(5):2320–6.
- 16 6. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K. AMPK and mTOR regulate autophagy
17 through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature
18 Publishing Group; 2011;13(2):132–41. Available from:
19 <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2152>
- 20 7. Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1-ATG13-FIP200
21 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy □. *J Biol*
22 *Chem*. 2009;284(18):12297–305.

- 1 8. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin
2 (mTOR) at Ser-2448 Is Mediated by p70S6 Kinase. *J Biol Chem* [Internet].
3 2005;280(27):25485–90. Available from:
4 <http://www.jbc.org/content/280/27/25485.abstract>
- 5 9. Degtyarev M, De Mazière A, Orr C, Lin J, Lee BB, Tien JY, et al. Akt inhibition
6 promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J*
7 *Cell Biol* [Internet]. Rockefeller University Press; 2008;183(1):101–16.
8 Available from: <http://jcb.rupress.org/content/183/1/101>
- 9 10. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Goldberg AL. Coordinate activation of autophagy
10 and the proteasome pathway by FoxO transcription factor. *Autophagy*. United
11 States; 2008 Apr;4(3):378–80.
- 12 11. Yang F, Chu X, Yin M, Liu X, Yuan H, Niu Y, et al. MTOR and autophagy in
13 normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition
14 deficits. *Behav Brain Res*. 2014;264:82–90.
- 15 12. Stambler I. The unexpected outcomes of anti-aging, rejuvenation, and life
16 extension studies: an origin of modern therapies. *Rejuvenation Res* [Internet].
17 2014;17(3):297–305. Available from:
18 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24524368>
- 19 13. Mitchell R, Hollis S, Rothwell C, Robertson WR. Age related changes in the
20 pituitary-testicular axis in normal men; lower serum testosterone results from
21 decreased bioactive LH drive. *Clin Endocrinol*. 1995;42(5):501–7.
- 22 14. Sun M, Shen W, Zhong M, Wu P, Chen H, Lu A. Nandrolone attenuates aortic
23 adaptation to exercise in rats. *Cardiovasc Res*. 2013;97(4):686–95.

- 1 15. White JP, Gao S, Puppa MJ, Sato S, Welle SL, Carson JA. Testosterone
2 regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Mol Cell*
3 *Endocrinol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013;365(2):174–86. Available from:
4 <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.10.019>
- 5 16. Kalinine E, Rigon E, Cagliari K, Kalinine I, Kazlauckas V, Branco C, et al.
6 Hormones and Behavior Nandrolone-induced aggressive behavior is associated
7 with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice. *Horm Behav*
8 [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;66(2):383–92. Available from:
9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.005>
- 10 17. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of
11 aging. *Cell*. United States; 2013;153(6):1194–217.
- 12 18. Kenyon C. The Plasticity of Aging : Insights from Long-Lived Mutants. *Cell*.
13 2005;120:449–60.
- 14 19. Taylor RC, Dillin A. Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring*
15 *Harb Perspect Biol*. United States; 2011 May;3(5).1-11
- 16 20. Lopez M, Nogueiras R, Tena-Sempere M, Dieguez C. Hypothalamic AMPK: a
17 canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol*. England;
18 2016 Jul;12(7):421–32.
- 19 21. Terman A. The Effect Of Age On Formation And Elimination Of Autophagic
20 Vacuoles In Mouse Hepatocytes. *Gerontology*. 1995;41(Suppl. 2):319–26.
- 21 22. Vittorini S, Paradiso C, Donati A, Cavallini G, Masini M, Gori Z, et al. The age-
22 related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-
23 related decline in liver proteolytic activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.

- 1 United States; 1999 Aug;54(8):B318–23.
- 2 23. Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a
3 novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of
4 mutant huntingtin and α -synuclein. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5641–52.
- 5 24. Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, Tolnay M, Winkler DT, Goedert M.
6 Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human
7 tauopathy. *Brain.* England; 2012 Jul;135(Pt 7):2169–77.
- 8 25. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2
9 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* [Internet].
10 2005 Sep 23;122(6):927–39. Available from:
11 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867405006926>

1 LEGENDA DAS FIGURAS

2 Fig.1) Imagens representativas de imunoconteúdo de LC3I e LC3II, Beclin-1, BCL-2,
3 AMPK e pAMPK(Thr172) analisados com western blotting em homogeneizado de
4 hipotálamo de camundongos (Jovens n=4; Idosos Óleo n=5, Idosos ND n=4)

5 Fig. 2) Representação gráfica do imunoconteúdo de LC3I analisado pela densidade ótica
6 normalizada em relação ao controle (*Cohen's d=1.547; #Cohen's d=1.086; Jovens
7 n=4; Idosos Óleo n=5, Idosos ND n=4).

8 Fig. 3) Representação gráfica da relação LC3II/LC3I normalizada pelo grupo controle
9 (*Cohen's d= 0.501; # Cohen's d= 0.003; Jovens n=4; Idosos Óleo n=5, Idosos ND
10 n=4).

11 Fig. 4) Representação gráfica do imunoconteúdo de Beclin-1 analisado pela densidade
12 ótica normalizada em relação ao controle (*One-Way ANOVA p=0,0025 (Bonferroni
13 Post-hoc) (Jovens n=4; ND n=5, CO n=4).

14 Fig. 5) Representação gráfica do imunoconteúdo de BCL-2 analisado pela densidade
15 ótica normalizada em relação ao controle (Jovens n=4; Envelhecidos Controle n=5;
16 Envelhecidos Nandrolona n=5).

17 Fig. 6) Representação gráfica do imunoconteúdo de AMPK analisado pela densidade
18 ótica normalizada em relação ao controle(Jovens n=4; Envelhecidos Controle n=5;
19 Envelhecidos Nandrolona n=5).

20 Fig. 7) Representação gráfica do imunoconteúdo de pAMPK(t172) analisado pela
21 densidade ótica normalizada em relação ao controle (Jovens n=4; Envelhecidos
22 Controle n=5; Envelhecidos Nandrolona n=5).

1 Fig. 8) Representação gráfica da relação pAMPK(t172)/AMPK normalizada pelo grupo
2 controle (Jovens n=4; Envelhecidos Controle n=5; Envelhecidos Nandrolona n=5).

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

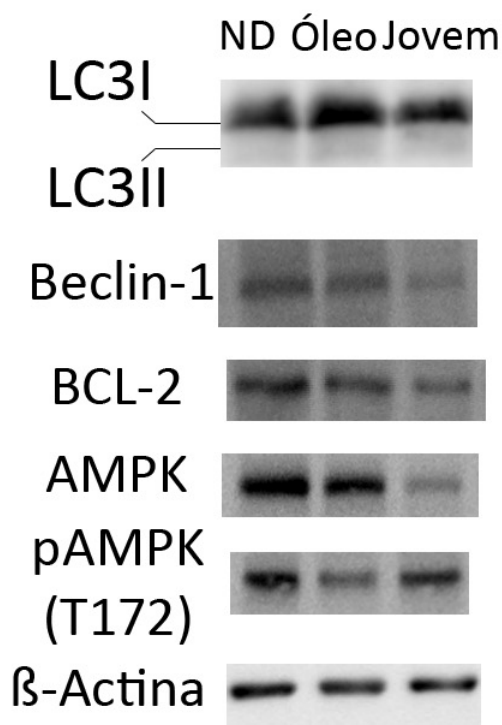
16

17

18

19

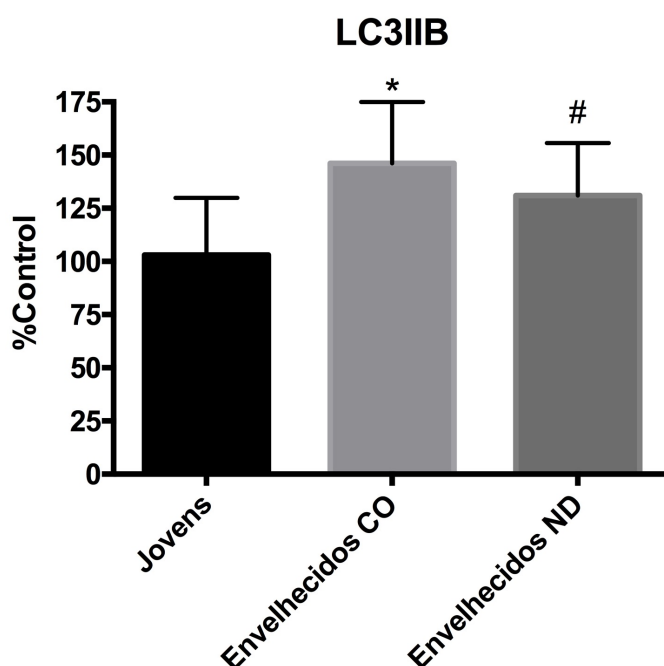
1 **FIGURA 1**



2

3

4 **FIGURA 2**



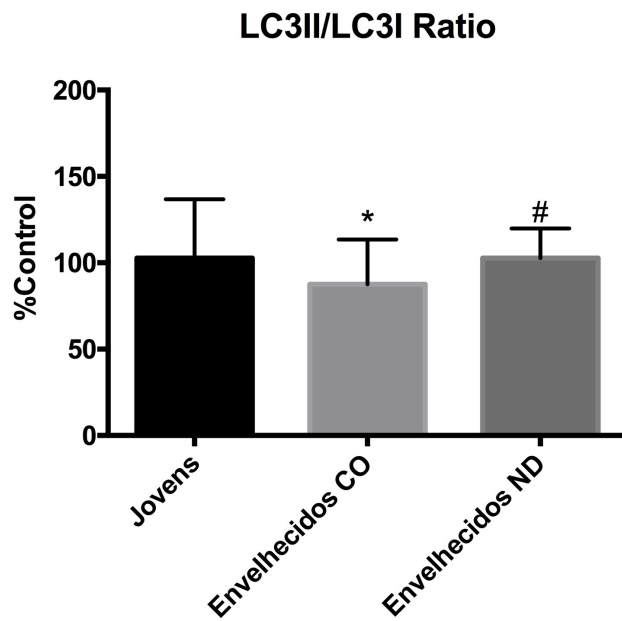
10

11

12

* Cohen's $d=1.547$ # Cohen's $d=1.086$
(Jovens $n=4$; Envelhecidos CO $n=5$, Envelhecidos ND $n=4$)

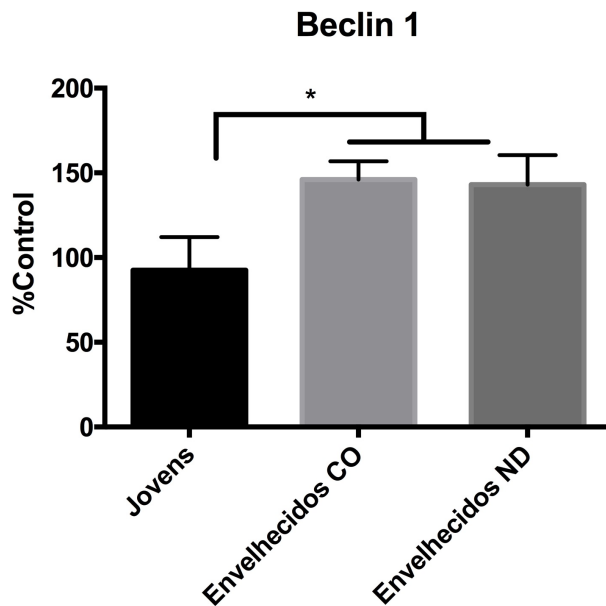
1 FIGURA 3



* *Cohen's d* = 0.501 # *Cohen's d* = 0.003
(Jovens n=4; Envelhecidos CO n=5, Envelhecidos ND n=4)

2

3 FIGURA 4



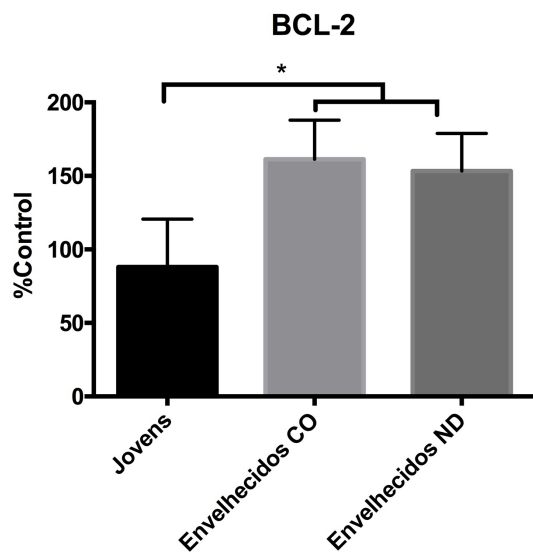
*One-Way ANOVA p=0,0025 (Bonferroni *Post-hoc*) (Jovens n=4; Envelhecidos ND n=5, Envelhecidos CO n=4)

4

5

6

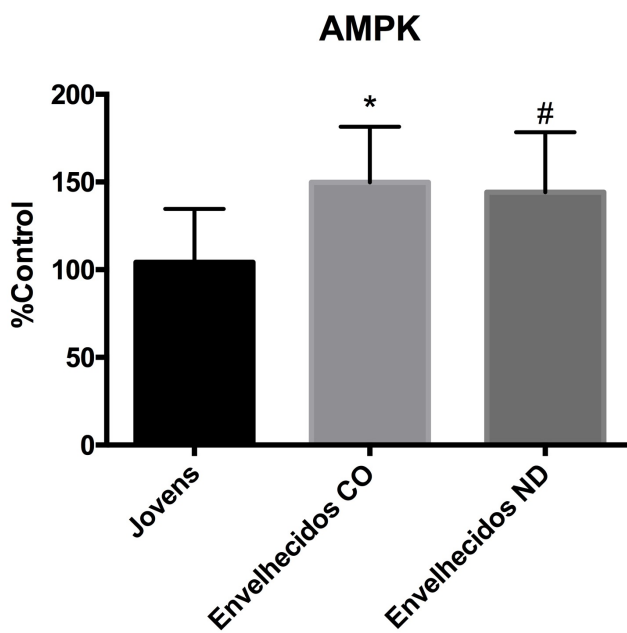
1 **FIGURA 5**



* One Way ANOVA (*post-hoc* Bonferroni) $p < 0.05$ (Jovens $n=4$; Envelhecidos CO $n=5$)

2

3 **FIGURA 6**



* Cohen's $d = 1.462$ # Cohen's $d = 1.236$
(Jovens $n=5$; Envelhecidos CO $n=4$, Envelhecidos ND $n=5$)

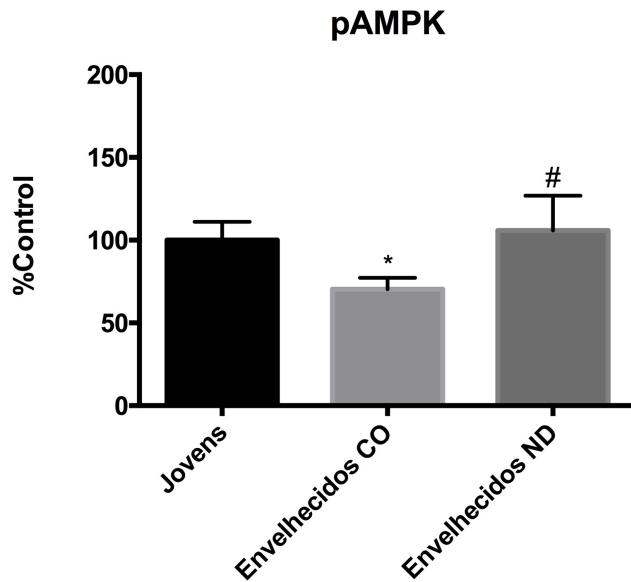
4

5

6

1

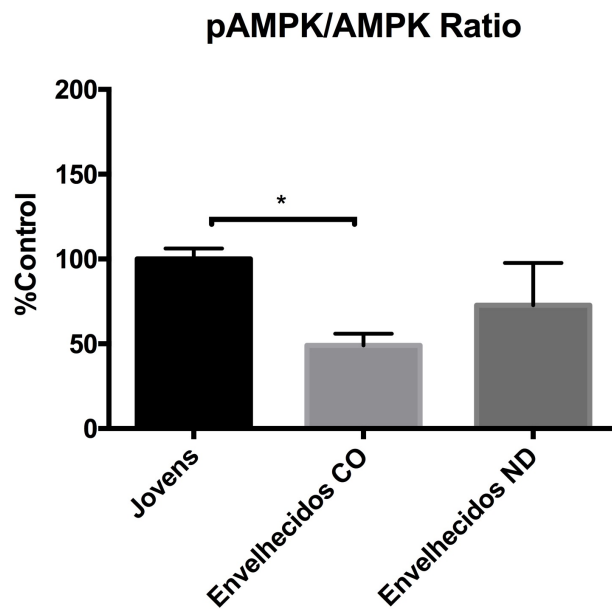
2 FIGURA 7



* Cohen's $d= 1.485$ # Cohen's $d= 0.154$
(Jovens $n=5$; Envelhecidos CO $n=4$, Envelhecidos ND $n=5$)

3

4 FIGURA 8



* One Way ANOVA (*post-hoc* Bonferroni) $p<0.05$
(Jovens $n=5$; Envelhecidos CO $n=4$, Envelhecidos ND $n=5$)

5