

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Departamento de Fisiologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**EFEITOS DA DHEA RELACIONADOS COM A IDADE SOBRE A  
AKT E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CORAÇÃO E  
ERITRÓCITOS DE RATOS**

**MARIA HELENA VIANNA METELLO JACOB**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Biológicas - Fisiologia

**Orientadora: Dra. Maria Flavia Marques Ribeiro**

**Co-Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein**

**Porto Alegre, 2009**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar todos os momentos da minha vida, me dando saúde,  
paciência e força.

À minha orientadora Maria Flávia Marques Ribeiro por confiar no meu  
trabalho e na minha capacidade de perseverar.

À minha co-orientadora Adriane Belló-Klein pelo grande apoio ao longo  
da tese e pelo incentivo no desenvolvimento dos artigos.

À professora Susana Llesuy e ao Prof. Carlos Severo Dutra Filho, pela  
oportunidade dos experimentos.

À Tânia Regina Gatteli pelas palavras gentis e sempre à disposição.

À minha amiga e parceira de todas as horas e experimentos, Daiane da  
Rocha Janner.

Ao Prof. Luis Carlos Kucharschi e ao colega Matheus P. Jahn pela parceria  
na realização dos experimentos.

Aos colegas Alex Sander Araujo, Roberta Hack Mendes, Mariane  
Bertagnolli, Karina Rabello, Rafael Fernandes, Lidiane Dal Bosco e Adarly Kroth pela  
parceria na realização de técnicas experimentais e pelas palavras amigas.

A todos os demais colegas dos laboratórios pelo incentivo ao trabalho.

Aos meus amados Rafael e Thomas, pelo estímulo, pela compreensão e  
paciência.

À minha família, por todo amor e carinho.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VI
RESUMO .....	VIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. HIPÓTESE.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
Objetivo Geral.....	26
Objetivos Específicos .....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
4.1. Animais .....	27
4.2. Biossegurança .....	27
4.3. Fármacos .....	28
4.4. Procedimentos Experimentais .....	29
4.4.1. Homogeneização .....	30
4.4.2. Quantificação de Proteínas .....	31
4.4.3. Dosagem de Hemoglobina .....	31
4.4.4. Superóxido Dismutase (SOD).....	32
4.4.5. Catalase (CAT).....	32
4.4.6 Glutathione S-Transferase (GST).....	33
4.4.7 Glutathione Peroxidase (GPx) .....	34
4.4.8. Glicose - 6 - fosfato desidrogenase (G6PDH).....	34
4.4.9 Tiorredoxina Redutase (Trx redutase) .....	35
4.4.10 Glutathione .....	35
4.4.11 Peróxido de Hidrogênio .....	35
4.4.12 Concentração Proteica por Western Blot.....	36
4.4.13 Análise Estatística .....	38
5. RESULTADOS.....	40
5.1 Artigo 1: <i>Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts</i> (Artigo publicado: Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2008, 112: 138-44) .....	40
5.2 Artigo 2: <i>DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in aged rats</i> (Artigo publicado: Steroids 2009, 74: 1045-50) .....	48
5.3. Artigo 3: <i>Age-related effects of DHEA on peripheral markers of oxidative stress</i> (Artigo publicado: Cell Biochemistry & Function 2009, 27: 1-6) .....	55

5.4. Artigo 4: <i>Redox imbalance influence in the myocardial Akt activation in aged rats treated with DHEA</i> (Artigo submetido: Rejuvenation Research)-----	62
6. <i>DISCUSSÃO CONCLUSIVA</i> -----	95
7. <i>PERSPECTIVAS</i> -----	109
8. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> -----	111



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Biossíntese dos Hormônios Esteróides-----	5
--	---

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AKT:** proteína quinase B

**ARE:** elemento responsivo a antioxidantes

**BNP:** peptídeo natriurético cerebral ou tipo B

**CAT:** catalase

**DHEA:** desidroepiandrosterona

**DHEAS:** desidroepiandrosterona sulfatada

**EAO:** espécies ativas de oxigênio

**eNOS:** óxido nítrico sintase endotelial

**ERK:** quinase regulada por sinal extracelular

**G6PDH:** glicose – 6 – fosfato desidrogenase

**GMPc:** monofosfato cíclico de guanosina

**GPx:** glutathiona peroxidase

**GR:** glutathiona redutase

**GSH:** glutathiona reduzida

**GSK-3  $\beta$ :** glicogênio sintase quinase-3 beta

**GSSG:** dissulfeto de glutathiona

**GST:** glutathiona S transferase

**HNE:** 4-hydroxy-2-nonenal

**LPO:** lipoperoxidação

**MAPK:** membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

**NO:** óxido nítrico

**NOS:** óxido nítrico sintase

**NRF2:** fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

**PI3K:** fosfatidilinositol 3 quinase

**PREG:** pregnenolona

**PREGS:** pregnenolona sulfatada

**PROG:** progesterona

**QL:** quimiluminescência

**SH:** grupamento sulfidril

**SOD:** superóxido dismutase

**SNC:** sistema nervoso central

**TRX:** tiorredoxina

## RESUMO

Os níveis de DHEA atingem seu pico entre a segunda e a terceira décadas de vida, e então começam a diminuir em torno de 2% ao ano. A diminuição da DHEA associada ao envelhecimento pode levar a doenças auto-imunes, disfunção sexual, osteoporose, alteração do metabolismo de lipídios, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Tais observações sugerem que o restabelecimento de DHEA aos níveis encontrados em jovens adultos pode ter efeitos benéficos nos distúrbios relacionados à idade. Muitas hipóteses têm sido propostas para o envelhecimento cardíaco, incluindo o acúmulo de radicais livres. Neste estudo objetivou-se determinar o papel da DHEA sobre o estresse oxidativo (tecido cardíaco e eritrócitos), por meio de medidas de dano oxidativo e de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, correlacionando-o com vias de sinalização, em diferentes etapas do envelhecimento de ratos Wistar machos saudáveis. No primeiro artigo, avaliamos os efeitos de diferentes concentrações de DHEA em distintas janelas temporais sobre o estresse oxidativo e sua relação com a ativação da Akt no miocárdio de ratos adultos (3 meses). A DHEA produziu diferenças significativas entre as diferentes janelas temporais sobre os parâmetros estudados, com uma resposta com perfil prooxidante no miocárdio dos ratos adultos. No segundo artigo, avaliamos os efeitos da administração crônica de DHEA sobre o estresse oxidativo e sua relação com a ativação da Akt no miocárdio de ratos jovens e velhos (3 e 18 meses). A DHEA produziu aumento na fosforilação da Akt e diminuiu a atividade da SOD nas duas idades estudadas. A ativação da via da Akt parece estar relacionada com mudanças nos parâmetros de estresse

oxidativo, de acordo com a idade investigada. A administração crônica de DHEA sobre o estresse oxidativo nos eritrócitos de ratos de diferentes idades (3, 13 e 18 meses) foi o objetivo do terceiro artigo, e como resultado a DHEA produziu efeito prooxidante sobre todas as idades, especialmente na idade de 13 meses. Parece que aos 13 meses há uma importante depleção de alguns antioxidantes específicos, que pode ter evidenciado os efeitos da DHEA. No último artigo avaliamos os efeitos da administração crônica de DHEA sobre o estresse oxidativo no coração de ratos jovens e velhos (3 e 24 meses), verificamos se tais mudanças estariam associadas às alterações no estado redox e correlacionamos a concentração de peróxido de hidrogênio à possível modulação da expressão de proteínas redox-sensíveis. A DHEA aumentou significativamente a atividade da GST no miocárdio dos grupos 3 e 24 meses. O fator idade diminuiu a concentração de peróxido de hidrogênio e a concentração proteica de Nrf2, independentemente do tratamento. Entretanto, a idade aumentou as concentrações de GST, Akt e p-Akt em ambos os grupos de 24 meses. O grupo 24 meses tratado com DHEA respondeu diferentemente considerando as medidas de GSSG, a atividade da GPx e a concentração da p-Akt. Os resultados obtidos por meio destes experimentos indicam um cenário em que a DHEA parece modular proteínas redox-sensíveis, bem como exerce diferentes efeitos em relação ao estresse oxidativo dependendo da idade. O uso indiscriminado deste hormônio poderia alterar vias redox-sensíveis de maneira a produzir adaptações inadequadas ou não necessariamente benéficas ao organismo.

---

## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é a deterioração progressiva das funções fisiológicas. No envelhecimento, há uma redução da capacidade de síntese de proteínas, diminuição das funções imunológicas, aumento da massa gorda, redução da força e da massa muscular, diminuição da densidade mineral óssea, resistência à insulina, depressão e aumento do risco cardiovascular (Lapchak e Araujo, 2001; Robinzon et al, 2003). Dados biológicos, epidemiológicos e demográficos têm gerado várias teorias que procuram identificar a causa ou os mecanismos responsáveis pelo envelhecimento. Nos últimos anos, a busca por uma única causa para o envelhecimento, como um único gene, ou a chave para o declínio do sistema corporal, tem sido substituída por uma visão de que este processo é extremamente complexo e multifatorial (Weinert e Timiras, 2003). Diferentes teorias para explicar o envelhecimento não são excludentes e se sobrepõem, descrevendo adequadamente este processo. Tais teorias formuladas para explicar o envelhecimento foram agrupadas em categorias: evolutiva, molecular, celular e sistêmica. Nos anos 40, a teoria evolutiva foi descrita baseada na doença de Huntington, inspirando a teoria do envelhecimento de acúmulo de mutações, a qual sugere que mutações podem ser acumuladas na população e levar a patologias e à senescência (Haldane, 1941). Porém, há poucas evidências experimentais para esta teoria. A teoria do corpo disponível, que é baseada também no conceito da teoria evolutiva, explica porque vivemos determinado período de tempo, sugerindo que o organismo é eficiente somente até o

sucesso reprodutivo - mas não relata uma causa específica para o envelhecimento (Loison et al, 1999).

Entre as teorias referentes à categoria molecular, está a teoria da regulação gênica do envelhecimento, a qual propõe que a senescência é resultado de mudanças na expressão gênica. Após delinear a expressão gênica do envelhecimento “normal”, houve tentativas para desenvolver intervenções que poderiam retardar ou acelerar o envelhecimento (Kanungo, 1975).

A teoria da senescência celular, formulada em 1965, propõe que há um limite para a capacidade replicativa normal das células (Hayflick, 1965). A senescência celular também pode ocorrer em resposta a diferentes eventos moleculares. Ainda dentro da categoria celular, está a teoria dos radicais livres, descrita em 1956 por Harman, sugerindo que a formação de radicais livres de oxigênio durante o metabolismo aeróbio resulta em dano oxidativo acumulado e, conseqüentemente, na senescência. O dano oxidativo celular é indiscriminado: há evidências de modificação de DNA, proteínas e lipídios. A oxidação de proteínas pode gerar desequilíbrio no metabolismo celular e nas vias de sinalização. O dano oxidativo a lipídios também prejudica a sinalização celular e a regulação iônica da membrana. A teoria dos radicais livres está bem consolidada, pois há evidências na literatura de que elevados níveis de dano a proteínas, aos lipídios de membrana e ao DNA são encontrados em animais velhos (Valko et al, 2007).

As teorias do envelhecimento com base na categoria sistêmica (ou de sistemas) estão relacionadas ao declínio da função dos sistemas de órgãos essenciais para o controle e a manutenção de outros sistemas dentro do

organismo e para a habilidade dos organismos de se comunicar e se adaptar ao meio em que estão inseridos. A teoria neuroendócrina propõe que o envelhecimento é conseqüência das mudanças nas funções neurais e endócrinas que são cruciais para a comunicação coordenada e para a responsividade de todos os sistemas corporais ao meio externo (Finch, 1976). Já a teoria neuroendócrina-sistema imune, relacionada ao envelhecimento, aborda a integração e a interação destes dois sistemas. Tal relação acontece por meio dos neuropeptídeos e citocinas presentes no sistema imune, por hormônios da hipófise anterior e posterior que controlam várias funções imunológicas importantes e pela ação das citocinas nas funções neuroendócrinas. Na maioria dos humanos senis, a imunossenescência está caracterizada pela redução da resistência a doenças infecto-contagiosas, pela menor proteção contra o câncer e pelo aumento de doenças auto-imunes (Franceschi et al, 2000; Ginaldi e Sternberg, 2003). O declínio na habilidade de responder às modificações homeostáticas está relacionado com três sistemas hormonais, os quais têm seus níveis hormonais diminuídos com o envelhecimento: estrogênio e testosterona (menopausa e andropausa, respectivamente), desidroepiandrosterona (DHEA) e seu ester sulfatado (DHEAS) (adrenopausa) e o eixo do hormônio do crescimento (GH)/IGF-I (somatopausa)(Lamberts et al, 1997).

A DHEA e a DHEAS são hormônios esteróides. Os hormônios esteróides são derivados do colesterol e são sintetizados principalmente nas adrenais, nas gônadas e na placenta. A síntese dos hormônios esteróides requer várias reações enzimáticas seqüenciais (Figura 1) que convertem o colesterol em glicocorticóides, mineralocorticóides ou hormônios sexuais,



iniciando-se com a conversão do colesterol em pregnenolona, reação catalisada pela enzima citocromo P450<sub>scc</sub> (*side chain cleavage*). A P450<sub>scc</sub> é uma enzima existente na membrana mitocondrial interna e tem por finalidade a remoção da cadeia lateral de 6 carbonos do colesterol. A taxa de síntese dos esteróides é controlada pelo transporte do colesterol do citoplasma para a membrana mitocondrial, onde a esteroidogênese começa pela produção de pregnenolona, a partir do colesterol. O transporte de colesterol através da membrana mitocondrial é feito pela proteína de regulação estereoidogênica aguda (*StAR – Steroidogenic acute regulatory protein*). A síntese de cada esteróide é dependente da expressão de enzimas e/ou da competição entre as enzimas por determinado substrato. A enzima P450<sub>c17</sub> presente nos testículos resulta na produção de androgênios e a P450 aromatase nos ovários resulta na produção de estrogênios. Nas adrenais estão expressas a P450<sub>c11β</sub> e P450<sub>c11AS</sub> resultando na produção de glicocorticóides e mineralocorticóides.

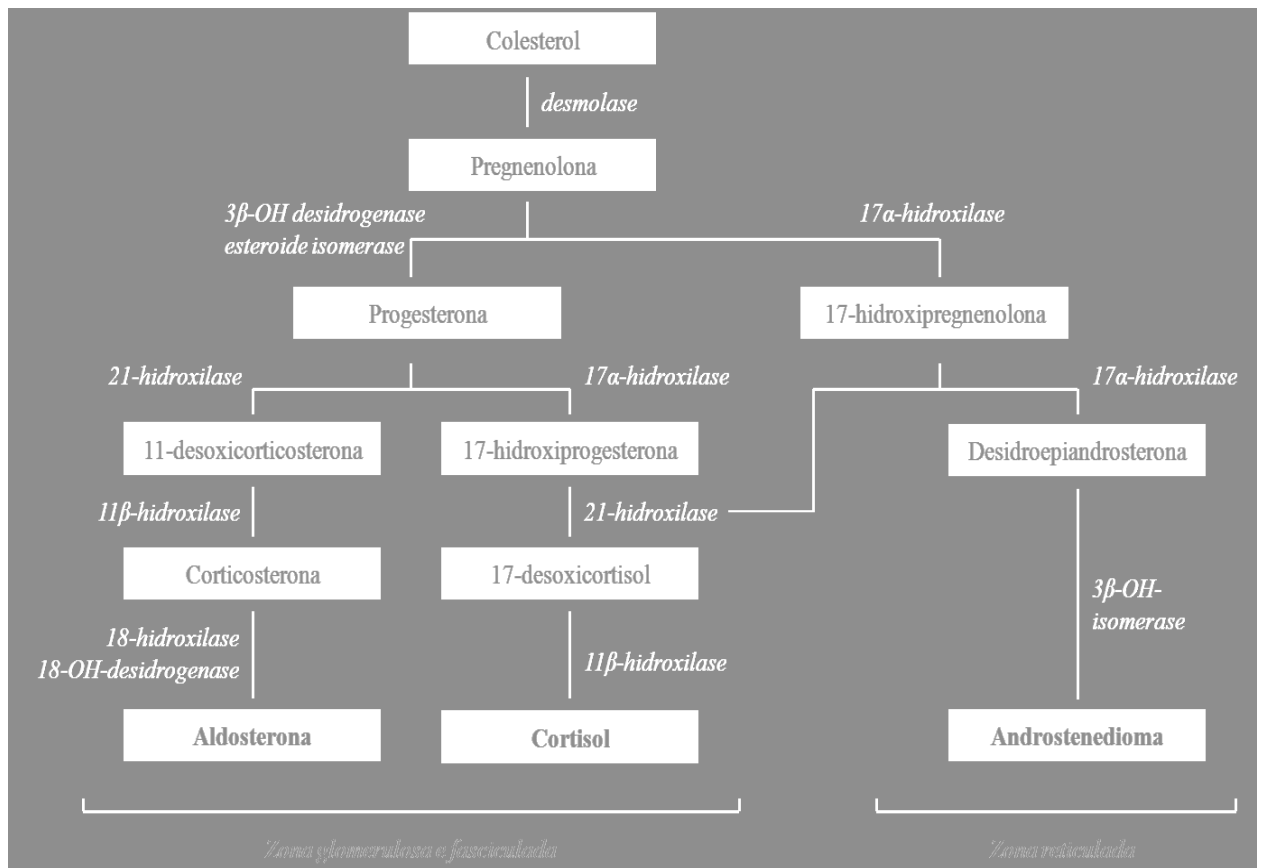


Figura 1: Biossíntese dos hormônios esteróides (adaptado de Reusch, 2005)

No homem, a DHEA é o esteróide mais abundantemente produzido pelas glândulas adrenais, e a concentração plasmática de DHEAS é 20 vezes superior a de qualquer outro hormônio esteróide circulante (Nakamura et al, 2004). A DHEAS circulante serve como reserva de DHEA, sendo esta conversão feita por sulfotransferases encontradas em diversos tecidos (Komesaroff, 2008). A fórmula molecular da DHEA é  $C_{19}H_{28}O_2$ , tendo peso molecular de 288,43 (g/mol). A meia-vida da DHEA no sangue é de aproximadamente 1-3 horas, enquanto a DHEAS tem uma meia-vida de 10 a 20 horas (Webb et al, 2006). Este esteróide pode ser convertido em muitos

metabólitos, de acordo com o tecido-alvo e o tipo celular. Seus principais metabólitos, incluindo a DHEAS, são 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, androstenediona e androstenediol.

A zona reticular do córtex adrenal pode somente sintetizar e secretar PREG (pregnenolona), PREGS (pregnenolona sulfatada), 17 $\alpha$ -OH PREG (17 $\alpha$ -hidroxi pregnenolona), DHEA e DHEAS, por não possuir a atividade da 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hidroxi esteróide desidrogenase), uma enzima presente nas outras zonas adrenocorticais (Roberts,1999). O córtex adrenal sintetiza e secreta entre 75 a 90% da DHEA presente no organismo, com o percentual restante sendo produzido pelos testículos ou ovários (Webb et al, 2006).

A DHEA também é classificada como neuroesteróide. O termo “neuroesteróide” foi cunhado pela primeira vez por Baulieu em 1981, referindo-se aos esteróides que são sintetizados no sistema nervoso central (SNC) e periférico, mesmo após remoção das gônadas e das glândulas adrenais de ratos. Portanto, estes esteróides podem ser sintetizados *de novo* (a partir do colesterol) nestas regiões, pelo menos parcialmente independentemente da secreção periférica (Corpechót et al, 1981, Baulieu, 1996; 1997). São neuroesteróides também a PREG e PREGS, a PROG (progesterona), seu metabólito alopregnenolona e a DHEAS. Os neuroesteróides exercem muitos efeitos no encéfalo humano e de roedores. Em diferentes regiões do encéfalo, as concentrações de DHEA variam de acordo com as circunstâncias comportamentais e ambientais, como estresse, reconhecimento sexual ou agressividade (Baulieu et al., 2001). A DHEA tem vários efeitos no SNC, como melhora da memória e aprendizagem, efeitos neurotróficos e neuroprotetores e redução do risco de ocorrência dos distúrbios neurodegenerativos relacionados

à idade (Wang et al., 2001). Tais efeitos podem ser mediados por sua conversão a estrogênios e androgênios ou por ação direta em neurônios e células gliais (Schumacher et al., 2000). A modulação da atividade de receptores de neurotransmissores está envolvida nos efeitos psicofarmacológicos da DHEA e permite explicar seu efeito anticonvulsivo, ansiolítico, antidepressivo e sedativo, bem como sua influência na memória (Schumacher et al., 2000).

Os mecanismos através dos quais a DHEA e a DHEAS agem ainda não foram plenamente estabelecidos. A DHEA age genomicamente através do receptor de androgênio e tem efeito sobre receptores da superfície celular (Mo et al, 2006). Sabe-se que a DHEA e seus metabólitos podem ativar receptores de estrogênio (especialmente o receptor de estrogênio tipo  $\alpha$ ), o receptor  $\alpha$  ativado por proliferadores de peroxissomos, o receptor X pregnano, além da existência de outros receptores associados à membrana (Webb et al, 2006). Foram encontrados sítios de ligação intracelulares específicos para a DHEA em linfócitos T de humanos e de camundongos (Okabe et al, 1995; Meikle et al, 1992), no fígado de ratos (Kalimi e Regelson, 1988) e na musculatura lisa vascular humana (Williams et al, 2002). Entretanto, ainda não foi convincentemente identificado um receptor nuclear específico para este esteróide (Widstrom e Dillon, 2004). Um sítio de ligação específico para a DHEA na membrana plasmática de células endoteliais de aorta bovina foi caracterizado por Liu e Dillon (2002). O tratamento de células endoteliais com DHEA gerou aumento na produção de óxido nítrico e na formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), além de inibir a apoptose. Tais efeitos foram exercidos por proteínas de membrana acopladas à proteína G

(Liu et al, 2007). A DHEA pode agir como modulador de receptores de membrana de neurotransmissores, como GABA<sub>A</sub> (Xilouri e Papazafiri, 2006), NMDA (Compagnone e Mellon, 1998) e receptores sigma 1 (Kurata et al, 2004).

Grandes quantidades de DHEA são sintetizadas durante a vida fetal como um precursor para o estrogênio placentário. A produção é interrompida após o nascimento e reinicia na idade entre 5 e 7 anos (Nippoldt e Nair, 1998). Os níveis de DHEA e DHEAS atingem seu pico entre a segunda e a terceira décadas de vida, e então começam a diminuir em torno de 2% ao ano (Genazzani et al, 2007). Em humanos, as concentrações de DHEA plasmática são de aproximadamente 1 - 4 ng/mL (0,003 – 0,015 µmol/L), e a DHEAS circulante tem concentrações muito maiores (3 - 10 µmol/L) (Webb et al, 2006). A diminuição da DHEA associada ao envelhecimento pode levar a doenças auto-imunes, disfunção sexual, osteoporose, alteração do metabolismo de lipídios, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Bácsi et al, 2007). O desenvolvimento e a incidência de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares estão relacionadas ao envelhecimento (Wu et al, 2007). Tais observações sugerem que o restabelecimento de DHEA aos níveis encontrados em adultos jovens pode ter efeitos benéficos nos distúrbios relacionados à idade.

Muitos estudos em animais sugerem que a DHEA tem efeito cardioprotetor, antiobesidade, diabetogênico, estimulador da resposta imune, além de propriedades carcinogênicas (Mühlen et al, 2007). A aplicabilidade destes resultados na fisiologia humana é questionável, uma vez que somente humanos e alguns primatas produzem DHEA em quantidades mensuráveis

(Mühlen et al, 2007). Em roedores, os níveis de DHEAS circulante são muito baixos – cerca de três ordens de magnitude menores do que nos humanos - o que torna impossível detectar alguma diminuição significativa relacionada à idade (Legrain e Girard, 2003). Entretanto, há um interesse significativo neste esteróide baseado em inúmeras observações clínicas, incluindo: um pronunciado declínio na sua produção desde a adultez até os 70 anos, número crescente de literatura científica mostrando mudanças nos níveis de DHEA associadas a muitas doenças, e observações de que a terapia de reposição com DHEA pode suavizar os declínios associados à idade em relação a várias funções (Mo et al, 2006). Dados obtidos em ensaios humanos (Nakamura et al, 2004; Mühlen et al, 2007; Yamada et al, 2007), modelos animais (Campbell et al, 2004; Wu et al, 2007) e estudos *in vitro* (Mo et al, 2006; Gallo et al, 1999) sugerem o uso potencial de DHEA como intervenção terapêutica. Uma vez que a secreção de DHEA exibe um padrão associado à idade, que está caracterizado por seu declínio com o avanço do envelhecimento, este esteróide tem gerado um grande interesse como um hormônio “anti-envelhecimento” (Arlt, 2004).

Estudos epidemiológicos mostraram que a incidência de aterosclerose e a mortalidade por doenças cardiovasculares estão inversamente associadas com as concentrações de DHEA e DHEAS, principalmente em homens (Barrett-Connor et al, 1995; Alexandersen et al, 1996; Legrain e Girard, 2003). A administração de DHEA (150 mg/dia) por 40 dias diminuiu os níveis de colesterol total, insulina e glicose em homens que apresentavam baixos níveis de DHEA, evidenciando seu efeito benéfico ao reduzir os fatores de risco para doenças coronarianas (Rabijewski e Zgliczynski, 2005). A incidência e

prevalência de doenças aterotrombóticas, como acidente vascular cerebral e doença coronariana, aumentam com o envelhecimento (Minamino e Komuro, 2007). Importantes estudos indicam a associação entre envelhecimento e modificações bioquímicas na parede arterial e em lipoproteínas (Picard et al, 1979; Nakamura et al, 1999). Além disso, o status hormonal, incluindo a DHEA (Orentreich et al, 1984; Migeon et al, 1957), também pode estar relacionado com o envelhecimento e a incidência aumentada de doença coronariana. A DHEA é um precursor dos esteróides sexuais e parte dos seus efeitos depende da sua conversão a estrogênios e androgênios. Os hormônios esteróides sexuais femininos exercem múltiplos efeitos no sistema vascular, reduzindo o desenvolvimento de aterosclerose, bloqueando a resposta ao dano na parede dos vasos e induzindo vasodilatação rápida (Arnlov et al, 2006, Khaw, 1996).

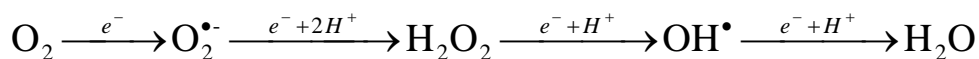
Nakamura e outros (2004) relataram a produção de aldosterona em outros tecidos que não a glândula adrenal, inclusive no coração de humanos com insuficiência cardíaca. Demonstraram também que o coração humano sadio produz DHEA, sugerindo que este hormônio pode ter um papel fisiológico importante na prevenção de doenças cardiovasculares. Além de aldosterona, têm sido descrito que a CYP17, uma enzima chave para síntese de DHEA e de cortisol, também é produzida em outros tecidos como a pele, estômago, fígado e encéfalo. A CYP17 tem duas atividades enzimáticas, a citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase e a 17,20- liase. A reação da 17 $\alpha$ -hidroxilase produz cortisol e a reação subsequente da 17,20- liase produz DHEA. Neste estudo, a expressão gênica da CYP17 e a produção de DHEA foram mostradas no coração humano controle, além da produção diminuída de DHEA no coração insuficiente – o que poderia estar contribuindo para uma piora do quadro de insuficiência . Estes

autores sugerem que a DHEA e/ou seus metabólitos exercem ação cardioprotetora por efeitos anti-hipertroóficos – evidenciados pela inibição do aumento do tamanho dos miócitos e da expressão gênica do peptídeo natriurético tipo B (BNP) (também conhecido como peptídeo natriurético cerebral), um marcador sensível de hipertrofia e insuficiência cardíacas. A quantidade de DHEA sintetizada pelo coração parece ser muito pequena para ter função endócrina, e deve funcionar de uma maneira autócrina ou parácrina no coração sadio (Nakamura et al, 2004).

Muitas hipóteses têm sido propostas para o envelhecimento cardíaco, incluindo alteração na permeabilidade e estrutura da membrana, duração prolongada do potencial de ação e acúmulo de radicais livres (Wu et al, 2007). Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, e por isso podem ser extremamente reativos e capazes de atacar inúmeras biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 1999). No processo de respiração celular, o oxigênio recebe quatro elétrons de uma única vez por ação da enzima citocromo oxidase, resultando na redução do oxigênio até água. Porém, devido à sua configuração eletrônica, o oxigênio recebe um elétron de cada vez – redução monoeletrônica – formando compostos intermediários, os quais são bastante reativos (Reação 1.1). Tais compostos são chamados de espécies ativas de oxigênio (EAO), e alguns deles são radicais livres. A formação destas moléculas ocorre em aproximadamente 5% de todo o processo de redução do oxigênio até água (Yu, 1994). Destes compostos intermediários, pode-se destacar o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). Os radicais livres apresentam ao menos um elétron



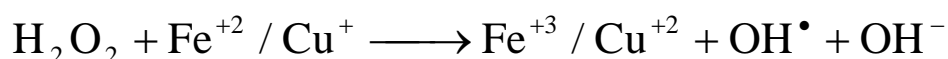
desemparelhado, normalmente no orbital mais externo. As espécies ativas de oxigênio (EAO) estão envolvidas em vários processos degenerativos pela sua propriedade de produzirem ou serem radicais livres (Meneghini, 1987; Yu, 1994).



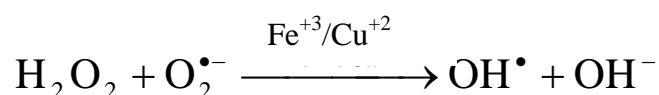
Reação 1.1: Formação das EAO, a partir da redução monoelétrica do O<sub>2</sub>

O estado excitado do oxigênio é denominado de oxigênio “singlet”, que também pode causar danos à célula (Halliwell, 2000), pois são as formas de oxigênio mais reativas ( $\Delta$  e  $\Sigma$ ). Os oxigênios “singlet” (especialmente a forma  $\Sigma$ ) são muito mais reativos que o oxigênio molecular no estado fundamental porque não possuem restrição de spin. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre porque apresenta todos os elétrons emparelhados, mas é capaz de atravessar facilmente as membranas biológicas, tendo a capacidade de formar espécies radicais (Halliwell e Gutteridge, 1999). O ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio à água e, a partir dele, são formadas as demais EAO. A enzima superóxido dismutase realiza a dismutação do radical superóxido formando peróxido de hidrogênio. O radical superóxido é mais estável e tem meia-vida mais longa que o radical hidroxil (Halliwell e Gutteridge, 1999). O peróxido de hidrogênio é o segundo intermediário da redução monovalente do oxigênio à água, podendo também ser produzido indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida da dismutação do ânion radical superóxido e/ou diretamente, pela redução bivalente do oxigênio molecular.

Embora não seja um radical livre, o peróxido de hidrogênio pode gerar o radical hidroxil (OH•), que também pode ser prejudicial para a célula (Del Maestro, 1980). Mesmo tendo uma meia-vida extremamente curta, o radical hidroxil é um dos mais potentes oxidantes nos sistemas biológicos, podendo reagir com praticamente todas as biomoléculas, e é formado quando o peróxido de hidrogênio reage com os íons ferro ou cobre, pela reação descrita por Fenton em 1894 (Reação 1.2). O radical hidroxil também pode ser formado pela reação de Haber-Weiss, quando o peróxido de hidrogênio reage com o ânion superóxido, com catálise de íons divalentes de metais de transição (Reação 1.3).



Reação 1.2: Reação de Fenton



Reação 1.3: Reação de Haber-Weiss (ou reação de Fenton superóxido assistida)

Já está bem evidenciado que as EAO provocam ou influenciam inúmeros processos degenerativos como a catarata, o enfisema, a artrite, a doença de Parkinson, a lesão isquêmica, o câncer, a aterosclerose, a artrite, a retinopatia, a psoríase, a asma, a anemia, a trombose e o envelhecimento

(Meneghini, 1987; Halliwell e Gutteridge, 1999). Em todas essas doenças o dano inicial provoca alterações intracelulares, como recrutamento de macrófagos, dano mitocondrial, interferência nas defesas antioxidantes, aumento do cálcio intracelular e conversão de xantina desidrogenase à xantina oxidase. As EAO também podem destruir proteínas, pela oxidação de grupamentos sulfidril, além de poderem oxidar bases púricas e pirimídicas, gerando alterações no DNA (Vaca et al, 1988; Fraga et al, 1994).

As EAO atacam os lipídios de membrana, num processo chamado de lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO). A LPO é um processo fisiológico que gera a renovação das membranas celulares (Halliwell, 2000). As reações de lipoperoxidação acontecem numa ordem seqüencial, com destaque para as seguintes etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, geralmente o radical hidroxil ou o oxigênio “singlet”, atrai um átomo de hidrogênio do lipídio formando um radical centrado no carbono, que se combina com o oxigênio e produz o radical peroxil. A fase de propagação começa com o radical peroxil quando este, por sua vez, remove um átomo de hidrogênio de um lipídio adjacente, formando um lipoperóxido e um outro radical centrado no carbono (podendo reagir com o oxigênio e propagar a reação). A fase de terminação acontece quando dois radicais reagem entre si formando um tetróxido instável, que é decomposto em carbonilas excitadas e oxigênio singlet. O lipoperóxido sofre rearranjo molecular, gerando malondialdeído e outros aldeídos tóxicos – como o 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) - que podem ser quantificados por ensaios bioquímicos (Thomas, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999).

O dano devido ao aumento na produção das EAO pode ser detectado pelo HNE, um marcador de lipoperoxidação. O HNE é um indicador da oxidação de lipídios e proteínas, reagindo com os aminoácidos cisteína, histidina e lisina formando adutos de Michael (Uchida, 2003). O HNE reage não somente com as proteínas de membrana, mas também com peptídeos intracelulares, como a glutathione (GSH) (Nakashima et al, 2003).

O sistema de defesa celular contra a toxicidade pelos radicais livres pode se desenvolver por diferentes mecanismos, incluindo enzimas que removem as EAO, “scavengers” de radicais livres, vitaminas antioxidantes (carotenóides, vitaminas C e E), compartimentalização celular (garantindo a separação de sítios de produção de EAO do resto da célula) e reparo tecidual (removendo bases oxidadas do DNA ou ácidos oxidados das membranas) (Marks et al, 1996).

As células também desenvolveram mecanismos de proteção para combater a toxicidade do oxigênio, os antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias capazes de neutralizar as ações dos radicais livres, prevenindo os danos oxidativos. A margem de segurança dessa proteção fornecida pelos antioxidantes no organismo é bastante limitada, e as defesas podem ser superadas se a produção oxidante aumentar (Rhoades e Pflanzler, 1992). Os antioxidantes – quando presentes – estão em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, e retardam ou previnem a oxidação deste substrato (lipídio, proteína, DNA ou outra molécula passível de oxidação). Localizados estrategicamente compartimentalizados nas organelas celulares, os antioxidantes minimizam os distúrbios no meio interno e preservam a atividade celular (Yu, 1994). Alguns dos mecanismos de ação dos antioxidantes são a

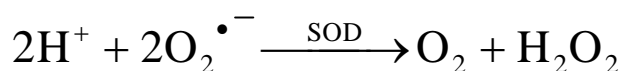
remoção do oxigênio presente no meio, a varredura das EAO e/ou de seus precursores, a inibição da formação das EAO, a quelação de metais que catalisam sua formação, a indução de aumento da produção de antioxidantes endógenos, entre outros (Halliwell, 1997).

Antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos atuam conjuntamente na proteção celular. A primeira linha de defesa é constituída pelos antioxidantes enzimáticos, evitando o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. A segunda linha de defesa objetiva impedir a propagação da LPO, e a terceira é constituída por enzimas de reparo a danos já instalados (Yu, 1994). Quando a substância neutraliza as EAO nas fases de iniciação ou propagação da LPO, gerando um composto menos reativo, ela é chamada de “scavenger”. Porém, se a substância absorve a energia de excitação dos radicais, de forma a neutralizá-los, ela é denominada “quencher” (Sies e Murphy, 1991; Halliwell, 1997).

A regulação das enzimas antioxidantes, fundamental para a manutenção da homeostase celular, depende de inúmeros fatores como especificidade do órgão, idade, estágio de desenvolvimento, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores (Harris, 1992). A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) são enzimas que constituem o importante sistema enzimático responsável pela detoxificação das EAO.

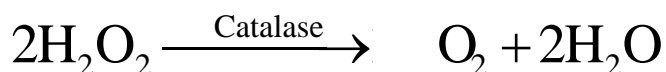
A SOD está presente em quase todos os organismos vivos, e é um sistema de defesa essencial para a sobrevivência em condições aeróbias (Belló-Klein, 1993; Favier, 1995). As superóxidos dismutases são um grupo de metaloenzimas que catalisam eficientemente a dismutação de dois íons superóxido para formar oxigênio e peróxido de hidrogênio (Reação 1.4), que é

menos reativo e que ainda pode ser degradado por outras enzimas (Fridovich, 1975; Halliwell e Gutteridge, 1999). Há três tipos de SOD: SOD cobre e zinco, presente no citoplasma, no meio extracelular e na membrana extracelular das células de eucariontes, SOD manganês, presente na matriz mitocondrial e SOD ferro, presente em bactérias (Yu, 1994).



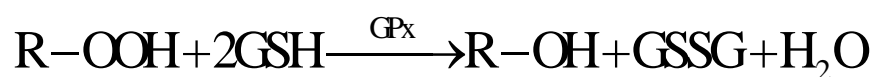
Reação 1.4: Dismutação do radical superóxido pela enzima superóxido dismutase

A catalase (CAT) é uma enzima que tem ação bastante específica, uma vez que atua apenas em reações com peróxido de hidrogênio, metila e etila (Reação 1.5) (Chance et al, 1979). A catalase está presente em todos os órgãos, entretanto, seus níveis de atividade podem variar nos diferentes tecidos e dentro de uma mesma célula (Yu, 1994). Presente principalmente em peroxissomos, a catalase se encontra em diferentes concentrações nos diversos órgãos expostos ao dano oxidativo, uma vez que órgãos como cérebro, pulmão e coração têm poucos peroxissomos. Um mecanismo de defesa alternativo para estes órgãos pode ser a difusão de peróxido de hidrogênio para o sangue, onde este reage com a catalase eritrocitária (Halliwell e Gutteridge, 1999).



Reação 1.5: Decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase

A glutathione peroxidase (GPx) está presente no citosol e na matriz mitocondrial. Esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos por meio da oxidação da glutathione reduzida (GSH) (Reação 1.6). No processo de oxirredução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e água, formando glutathione dissulfeto (GSSG) (Halliwell e Gutteridge, 1999; Yu, 1994). As glutathione peroxidases são constituídas de quatro subunidades de proteína, cada uma contendo um átomo de selênio no seu sítio ativo. Há dois tipos de glutathione peroxidase: a dependente de selênio e a independente de selênio, encontrada em diferentes concentrações no citosol e na matriz mitocondrial (Halliwell e Gutteridge, 1999; Yu, 1994). Pequenas quantidades de selênio são fundamentais na dieta dos animais: o consumo de selênio fornece o cofator para a família das enzimas glutathione peroxidases (Halliwell e Gutteridge, 1999). Há ainda a glutathione peroxidase plasmática (Punchard e Kelly, 1996).



Reação 1.6: Redução de hidroperóxidos pela enzima glutathione peroxidase

A glutathione (GSH) é a fonte primária doadora de elétrons para os radicais livres - utilizada por todos os tipos de glutathione peroxidases - evitando assim que danifiquem outras moléculas. A GSH é o principal e mais abundante tiol envolvido na defesa antioxidante celular e é produzida em todos os órgãos. Presente principalmente na sua forma reduzida (GSH), a glutathione

age na detoxificação de xenobióticos e de compostos deletérios naturais, como peróxido de hidrogênio, outros peróxidos e radicais livres. A depleção de GSH está associada a muitas doenças como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares em humanos (Pastore et al, 2003).

A razão entre a glutathiona reduzida e a glutathiona oxidada (GSH/GSSG) em células normais é alta, tendo mais glutathiona reduzida do que glutathiona oxidada no estado de equilíbrio da célula. Além disso, há um mecanismo de regeneração da glutathiona reduzida. A glutathiona oxidada pode ser ressintetizada pela interação com nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida (NADPH) - fonte de elétrons redutores - através da enzima glutathiona redutase.

O NADPH essencial para a reação de ressíntese da glutathiona pode ser fornecido por vários sistemas enzimáticos, e entre os mais conhecidos está a via pentose fosfato. A primeira enzima desta via é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e a velocidade na qual esta rota funciona é controlada pelo fornecimento de  $\text{NADP}^+$  para a G6PDH (Halliwell e Gutteridge, 1999). A DHEA é um potente inibidor não-competitivo da enzima G6PDH, a qual converte glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato em um processo dependente de  $\text{NADP}^+$  - produzindo NADPH (Leopold e Loscalzo, 2000). Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* indicam que a DHEA inibe a atividade da G6PDH através da ligação ao complexo ternário substrato-coenzima-enzima e pode, como resultado, promover o estresse oxidativo (Leopold e Loscalzo, 2000). Outros estudos com DHEA indicam a importância da inibição da G6PDH na redução da inflamação, da hiperplasia e da carcinogênese, fornecendo



evidências de que a inibição desta enzima pode retardar o desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento (Schwartz and Pashko, 2004).

Outro grupo de enzimas que tem papel fisiológico essencial na detoxificação são as chamadas glutathione – S – transferases (GST). Elas agem na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. As GSTs catalisam a reação destes compostos com o grupamento SH da glutathione, neutralizando os sítios eletrofílicos transformando-os em compostos hidrossolúveis e de mais fácil metabolização (Habig et al, 1974). Além de suas funções catalíticas, diversas GSTs podem atuar como proteínas carreadoras intracelulares do heme, da bilirrubina, de pigmentos biliares e esteróides, os quais podem se ligar de modo não-enzimático a proteínas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A capacidade intracelular de homeostase redox é substancialmente baseada na glutathione e na tioredoxina (Valko et al, 2007). Entre outros antioxidantes, a tioredoxina (Trx), uma proteína redox-sensível, está presente no coração de mamíferos. A tioredoxina não está envolvida somente nas funções citoprotetoras, mas também na regulação da proliferação celular e no processo de envelhecimento. O sistema da tioredoxina consiste em duas enzimas antioxidantes oxirredutases: a tioredoxina (Trx-1) e a tioredoxina redutase. Este sistema age como um scavenger de peróxido de hidrogênio. A função protetora mais importante da Trx-1 é na hipertrofia cardíaca. Estudos sugerem que a Trx-1 inibe a hipertrofia cardíaca em modelos animais e o aumento da Trx-1 pode ser um mecanismo de defesa para reduzir a hipertrofia induzida pelo estresse oxidativo (Altschmied e Haendler, 2009).

Os eritrócitos são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo. Os eritrócitos são expostos freqüentemente ao estresse oxidativo devido à geração contínua de EAO pela auto-oxidação da hemoglobina. Além disso, níveis elevados de ácidos graxos insaturados estão presentes nos eritrócitos e constituem substratos para as reações de peroxidação (Katherine et al, 1997). Os eritrócitos constituem um importante e valioso modelo sistêmico para estudar os efeitos do envelhecimento celular, já que representam um marcador periférico (Óztürk e Gümüslü, 2004).

Em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado (Gillham et al, 1997). Se este balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou o organismo está sob “estresse oxidativo”, com potenciais danos (Sies, 1999). O estresse oxidativo pode se instalar por aumento na produção de radicais livres e/ou por redução na capacidade antioxidante (Belló-Klein, 1993; Travacio e Llesuy, 1996). As possibilidades de resposta dos organismos ao estresse oxidativo são a adaptação, por aumento na atividade antioxidante, ocasionando hiperproteção à célula contra futuros danos; o dano tecidual, por agressão a lipídios, carboidratos ou proteínas; e a morte celular, por necrose ou apoptose (Pincemail, 1995; Halliwell e Gutteridge, 1999).

As EAO estão envolvidas no processo de dano celular, inibindo as funções normais de lipídios, proteínas e DNA e também podem ter importante papel fisiológico na regulação e na sinalização intracelular (Valko et al, 2007), por transmissão de sinais “downstream” via alterações induzidas no estado redox (Ding et al, 2008). Um dos mecanismos das alterações na fosforilação de determinadas proteínas é a variação da concentração das EAO, por meio da

alteração do estado redox intracelular e/ou pela modificação oxidativa de proteínas (Paravicini e Touyz, 2006). O peróxido de hidrogênio pode diretamente alterar a conformação de proteínas e promover maior susceptibilidade à fosforilação (Cai et al, 2003). As células são capazes de gerar EAO intracelularmente, induzindo e mantendo vias de transdução de sinais (Dröge, 2002). O ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, extremamente reativo, podem ser tóxicos em altos níveis, mas também podem regular genes controladores do crescimento e da diferenciação celular (Yoshioka et al, 2006).

As EAO são capazes de promover a translocação da Trx para o núcleo, onde pode modular a transcrição de proteínas redox-sensíveis (Altschmied e Haendler, 2009). Outro papel de destaque na transcrição de proteínas redox-sensíveis é representado pelo fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (Trachootham et al, 2008). Ding e colaboradores (2008) sugerem que o peróxido de hidrogênio exerce duas funções: como molécula mensageira de sinal para a diferenciação muscular e como mediador na síntese de glutathione via ativação do Nrf2. De fato, com o uso de modelos deficientes de Nrf2 (em células e camundongos), Kensler e colegas demonstraram que o Nrf2 protege contra a morte celular induzida por vários oxidantes – entre eles o peróxido de hidrogênio – principalmente diminuindo as concentrações celulares de EAO (Kensler et al, 2007).

Evidências sugerem que o Nrf2 exerce papel fundamental na regulação da homeostase celular da GSH (Harvey et al, 2009). O Nrf2, que se liga ao elemento responsivo a antioxidantes (ARE), tem sido sugerido como um fator de transcrição fundamental na região promotora de vários genes,

codificando para enzimas antioxidativas e de fase 2 – envolvidas na detoxificação de xenobióticos eletrofilicos - em vários tipos de células e tecidos (Zhu et al, 2005). O aumento de antioxidantes endógenos e de enzimas de fase 2 – em células e/ou tecidos cardíacos constitui uma estratégia protetora contra o dano cardíaco oxidativo (Zhu et al, 2005). Na literatura científica está bem evidenciado que alterações no estado redox intracelular da glutathiona podem afetar muitas vias de sinalização que participam de respostas fisiológicas, desde a proliferação celular até a expressão gênica regulada pelo estado redox. Há evidências que mudanças no equilíbrio redox celular em direção ao dano oxidativo leva à oxidação e propicia a translocação do Nrf2 para o núcleo (Kweon et al, 2006).

Tanaka e colegas (2005) demonstraram que níveis moderados de peróxido de hidrogênio ativam as vias da Akt (ou proteína cinase B - PKB) e da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), possivelmente devido a mudanças conformacionais em proteínas de membrana causadas pelo estresse oxidativo intracelular. Araujo e colegas sugerem que o peróxido de hidrogênio pode diretamente alterar a conformação da Akt promovendo maior susceptibilidade para a fosforilação ou, ainda secundariamente, promovendo o desequilíbrio do estado redox (Araujo et al, 2008). A concentração relativamente baixa de EAO – como exemplos o peróxido de hidrogênio e o superóxido – pode induzir a proliferação celular pela via da ERK (quinase regulada por sinal extracelular) ou da Akt por meio da estimulação de receptores dos fatores de crescimento (Yoon et al, 2002).

A Akt é uma serina/treonina cinase, pertencente à superfamília de proteínas cinases AGC (proteína cinase A dependente de AMPc/Proteína

cinase G/Proteína cinase C), a qual estimula vias de crescimento e inibe a apoptose (Scheid e Woodgett, 2003). Em mamíferos foram encontradas três isoformas de Akt: PKB  $\alpha$ /Akt1 (expressa na maioria dos tecidos), PKB  $\beta$ /Akt2 (expressa prioritariamente nos tecidos-alvo da insulina) e PKB  $\gamma$ /Akt3 (é a forma menos expressa, mas sua expressão é grande no encéfalo) (Sale e Sale, 2008). A Akt é uma proteína citosólica envolvida na regulação do metabolismo, do crescimento, da proliferação e da sobrevivência celular. O envolvimento da Akt na sobrevivência celular é um processo complexo, o qual exige uma extensa cascata de eventos intracelulares (Mullonkal e Toledo-Pereyra, 2007). A Akt age como uma cinase de sobrevivência fosforilando várias moléculas reguladoras da apoptose (Mullonkal e Toledo-Pereyra, 2007). Quando a Akt é ativada, dissocia-se da membrana plasmática e fosforila diversos substratos no citoplasma e no núcleo (Sale e Sale, 2008). Esta via tem sido associada com a regulação do crescimento cardíaco fisiológico e da função cardíaca (DeBosch et al, 2006).

A via da insulina/Akt é uma via muito importante no processo de envelhecimento (Minamino e Komuro, 2007). Uma das principais funções da Akt é promover a sobrevivência celular mediada por fatores de crescimento e bloquear a apoptose (Song et al, 2005). A atividade da Akt tem sido vista como um recurso de intervenção molecular no tratamento de cardiomiopatias resultantes de transformações debilitantes decorrentes do envelhecimento (Sussmann, 2007). A transição da hipertrofia cardíaca para insuficiência avançada em corações de humanos está associada a um aumento expressivo na fosforilação da Akt (Jacobshagen et al, 2008).

Dessa forma, ao estudarmos o efeito da DHEA sobre o estresse oxidativo e a expressão da Akt - e outras proteínas redox-sensíveis - em diferentes etapas do envelhecimento, procuramos delinear o papel que este esteróide exerce, não somente como anti ou prooxidante, mas sua ação sobre a modulação dessas proteínas. A DHEA é comumente usada em vários países como suplemento nutricional e na reposição hormonal de homens e mulheres (Legrain e Girard, 2003). Há também o uso deste esteróide em doses farmacológicas ou supra-fisiológicas por atletas e desportistas com o objetivo de produzir hipertrofia muscular (Labrie et al, 2006). Por isso, é necessário que muitos estudos sejam realizados para se certificar a eficácia e segurança desse tratamento e da reposição hormonal com DHEA no envelhecimento.

## **2. HIPÓTESE**

A administração exógena de DHEA tem efeito sobre a expressão protéica da Akt e o status oxidativo, sendo este efeito dose e tempo-dependente sobre o tecido cardíaco de ratos machos adultos.

O tratamento com DHEA gera diferentes respostas em relação aos parâmetros de estresse oxidativo e às proteínas redox-sensíveis dependendo da idade do animal.

O tratamento crônico com DHEA pode alterar marcadores periféricos de estresse oxidativo em ratos velhos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral:

Determinar o papel da DHEA sobre o estresse oxidativo (cardíaco e periférico), por meio de medidas de dano oxidativo e de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, correlacionando-o com vias de sinalização, em diferentes etapas do envelhecimento de ratos Wistar machos sadios.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

a) Avaliar o efeito agudo (6 e 24 horas) de diferentes doses (1, 10 e 50 mg/kg) de DHEA sobre marcadores de estresse oxidativo e sua relação com a ativação da Akt no miocárdio de ratos adultos (1º artigo).

b) Avaliar o efeito da administração crônica (10 mg/kg) de DHEA sobre alguns marcadores de estresse oxidativo e sua relação com a ativação da Akt no miocárdio de ratos velhos (2º artigo).

c) Avaliar o efeito da administração crônica de DHEA sobre alguns marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de ratos de diferentes idades (3º artigo).

d) Avaliar o efeito da administração crônica de DHEA sobre alguns marcadores de estresse oxidativo no miocárdio de ratos velhos e se tais alterações podem estar associadas às variações do estado redox. Ainda, correlacionar a concentração de peróxido de hidrogênio com a modulação da expressão de proteínas redox-sensíveis como a tioredoxina-1, o Nrf2 e a Akt (4º artigo).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 3, 13, 18 e 24 meses de idade provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

Os procedimentos experimentais a que os animais foram submetidos obedeceram às normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - <http://www.cobea.org.br>) e o projeto (número 2006535) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **4.2 Biossegurança**

Durante a execução da metodologia proposta, os pesquisadores envolvidos usaram luvas de procedimentos cirúrgicos e aventais para sua própria proteção. Quando necessário, foi utilizado também máscara e óculos de proteção. Além destes cuidados, a preparação das soluções ocorreu dentro



de capela de exaustão. O descarte dos resíduos não-tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum. Os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de sua eliminação. As carcaças dos animais foram congeladas e entregues ao Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da UFRGS para procedimento de eliminação.

### **4.3 Fármacos**

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

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

### **4.4 Procedimentos Experimentais**

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

1) Protocolo experimental para o tratamento agudo:

1.1) Agudo 6 horas: ratos machos com três meses de idade receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de DHEA 1, 10 ou 50 mg/kg e foram decapitados após 6 horas.

1.2) Agudo 24 horas: ratos machos com três meses de idade receberam uma injeção intraperitoneal de DHEA 1, 10 ou 50 mg/kg e foram decapitados após 24 horas.

2) Protocolo experimental para o tratamento crônico:

Tratamento de animais com diferentes idades: ratos com 3, 13, 18 e 24 meses de idade receberam uma injeção subcutânea de DHEA (10mg/kg) por semana durante 5 semanas.

As concentrações plasmáticas de DHEA foram medidas pelo nosso grupo (dados não publicados) nos dias 1, 4 e 7 após uma única dose (10 mg/kg). Os níveis de DHEA foram mantidos até o sétimo dia, justificando o tratamento semanal, o veículo e a quantidade a ser injetada.

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

O sangue troncular dos animais de 3, 13 e 18 meses foi coletado em tubos contendo heparina (agente anticoagulante) após a decapitação. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorval RC 5B-rotor SM24, Du Pont Instruments, EUA), e o plasma

foi retirado e congelado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%) e novamente centrifugados por três vezes (1:1 v/v). Uma parte foi ressuspensa em soro para medida imediata de lipoperoxidação, e ao restante foi adicionado uma solução de ácido acético 1mM e sulfato de magnésio 4mM e congelado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores dosagens das enzimas antioxidantes (Repetto et al, 1996).

#### **4.4.1 Homogeneização**

Os corações foram rapidamente retirados, seccionados transversalmente e congelados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as dosagens posteriores. Cada secção foi destinada para uma técnica, de modo que a mesma região do coração fosse analisada em todos os animais. No 1º artigo, utilizamos o ventrículo esquerdo para a técnica de western blot. Para as dosagens posteriores de LPO e atividade das enzimas antioxidantes os tecidos foram homogeneizados por 30 segundos em Ultra-Turrax na presença de KCl 1,15% (5mL/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e é utilizado para que não ocorra degradação das enzimas das quais as atividades serão medidas. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 1.000 x g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24) e o sobrenadante retirado e congelado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  (LLESUY et al., 1985).

Para técnica de Western Blot, parte do tecido cardíaco foi rapidamente retirado e homogeneizado por 30 segundos em Ultra-Turrax, na

presença do tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina (5 g/mL). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 x g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24) e o sobrenadante retirado e congelado em freezer a -80°C.

#### **4.4.2 Quantificação de Proteínas**

Para as medidas de estresse oxidativo, as proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, em 1951, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina. Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL. Para a técnica de Western Blot, as proteínas foram medidas pelo método de Bradford (1976) que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 595 nm e os resultados expressos em mg/mL.

#### **4.4.3 Dosagem de Hemoglobina**

Para a dosagem da hemoglobina, os eritrócitos foram lavados em soro fisiológico e centrifugados 3 vezes (por 10 minutos a 3.000 rpm). Esta análise foi feita utilizando-se uma mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin. Este reativo reage com a hemoglobina formando cianometahemoglobina, que foi lida em espectrofotômetro a 546 nm. Os resultados são expressos em mg/mL de hemoglobina (Drabkin e Austin, 1935).

#### **4.4.4 Superóxido Dismutase (SOD)**

A técnica utilizada neste trabalho para determinação da atividade da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Como não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. A oxidação do pirogalol é detectada espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, são utilizados 973  $\mu\text{L}$  de tampão Tris 50 mmol/L (pH 8,2), 8  $\mu\text{L}$  de pirogalol 24 mmol/L, 4  $\mu\text{L}$  de catalase 30  $\mu\text{mol/L}$ . O aumento na absorbância é acompanhado na leitura espectrofotométrica a 420 nm durante 2 minutos. Esta curva obtida é utilizada como branco. Também foi realizada uma curva padrão utilizando-se três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), por meio da qual obtém-se a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados são expressos em U SOD/mg proteína, segundo Marklund, 1985.

#### **4.4.5 Catalase (CAT)**

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio e obedece a uma cinética de pseudo-

primeira ordem. Sendo assim, sua atividade pode ser mensurada pela avaliação do consumo do  $H_2O_2$ .

Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a realização deste ensaio foi utilizada solução tampão fosfato 50 mmol/L (pH=7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L.

Foram adicionados 955  $\mu$ L do tampão fosfato e 10  $\mu$ L de amostra do tecido na cubeta de quartzo. Essa cubeta é colocada no espectrofotômetro concomitantemente a outra cubeta contendo somente tampão fosfato, a qual é descontada da primeira cubeta. Após, foram adicionados 35  $\mu$ L do  $H_2O_2$  e feito o monitoramento da diminuição da absorbância a 240 nm. Os resultados são expressos em picomoles por miligrama de proteína, segundo AEBI, 1984.

#### **4.4.6 Glutathione S-transferase (GST)**

As glutathione transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutathione com vários xenobióticos, tendo um importante papel na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto 1 cloro-2,4-dinitro benzeno (CDNB), sendo a conjugação deste com GSH utilizada para quantificar sua atividade. A formação do composto corado dinitro-fenil-glutathione (DNP-SG) é lida espectrofotometricamente a 340 nm. Para realização deste ensaio são utilizados 850  $\mu$ L de solução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L (pH = 6,5), 50  $\mu$ L de GSH, 50  $\mu$ L de homogeneizado de tecido cardíaco e 150  $\mu$ L de CDNB

(20mM). A atividade da GST é expressa em nmoles/min x mg de proteína (Mannervik e Gluthemberg, 1981).

#### **4.4.7 Glutaciona peroxidase (GPx)**

A enzima glutaciona peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutaciona reduzida (GSH) para formar glutaciona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx. A atividade da glutaciona peroxidase foi lida em espectrofotômetro a 340 nm, em um meio de reação que continha: solução tampão fosfato 140 mmol/L, EDTA 1 mmol/L (pH 7,5), NADPH 0,24 mmol/L; azida sódica 1 mmol/L, utilizada para inibir a atividade da catalase; GSH 5 mmol/L; glutaciona redutase (GR) 0,25 U/mL e, por fim, hidroperóxido de tert-butila 0,5 mmol/L (Flohé e Gunzler, 1984).

#### **4.4.8 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)**

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase foi determinada pelo método descrito por Leong e Clark (1984), no qual a mistura de reação (1 mL) contém: 100 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mmol/L NADP<sup>+</sup>, e amostra. A reação é iniciada pela adição de 1 mmol/L de glicose-6-fosfato e lida em espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade de G6PDH corresponde a 1 mmol de substrato transformado por minuto e a atividade específica é representada como unidades por mg de proteína.

#### **4.4.9 Tiorredoxina redutase (Trx redutase)**

A atividade da tiorredoxina redutase foi determinada usando 5, 5'-ditiobis (2- ácido nitrobenzóico) (DTNB) e NADPH. O método está baseado na redução do DTNB, que é observada por um aumento de absorbância a 412 nm. A quantidade de DTNB reduzida é calculada usando o coeficiente de absorção de  $13,6 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Holmgren e Björnstedt, 1995).

#### **4.4.10 Glutationa**

Para determinar a glutatona total, o tecido foi desproteínezado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 min a 1.000 x g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação continha tampão fosfato (pH 7,2) 100 mmol/L, ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutatona redutase 0,2 U/mL e 70  $\mu\text{mol/L}$  de 5, 5' ditiobis (2- ácido nitrobenzóico). Para determinar a glutatona reduzida, o sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L, reagiu com 70  $\mu\text{mol/L}$  de ácido nitrobenzóico e foi lido espectrofotometricamente a 340nm (Akerboom e Sies, 1981).

#### **4.4.11 Peróxido de hidrogênio**

O método para determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio está baseado na oxidação do vermelho de fenol por este peróxido mediada



pela peroxidase de rabanete. Fatias de tecido cardíaco foram incubadas por 30 minutos em tampão (fosfato de potássio 10 mmol/L, NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). O sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1 mol/L e efetuada a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mg de proteína (Pick e Keisari, 1980).

#### **4.4.12 Concentração proteica por Western Blot**

Após quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), foi utilizado o sistema *mini-protean* (Bio-Rad) para a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE a 10-14% (gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio). O homogeneizado contendo 90µg de proteína da amostra foi preparado com tampão de carga (Tris 65 mmol/L, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1%). Para a identificação do peso molecular das proteínas de interesse, utilizou-se marcador de peso molecular “full range” (Amersham Pharmacia). As amostras foram aquecidas a 100°C durante 2 minutos em banho seco (modelo 330-3D, Nova Ética), e a eletroforese foi efetuada a 120v por 3 horas na presença de tampão de corrida, contendo glicina 192 mmol/L, Tris 25 mmol/L e SDS 0,1%, pH 8,3. A separação das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular. A seguir, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de

eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham) e com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mmol/L e metanol a 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada a 100v por 60 minutos.

Para o bloqueio das ligações a proteínas inespecíficas, as membranas foram incubadas com leite em pó a 1% em TTBS (Tris 20 mmol/L, NaCl 140 mmol/L e Tween 20 a 0,05%) por 60 minutos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por, no mínimo, 12 horas em agitação constante a 4°C com os anticorpos primários diluídos em TTBS, todos contendo BSA 2,5 % e azida sódica a 1%. Os anticorpos primários utilizados foram anti-Akt fosforilada (Ser 473) policlonal (coelho), anti-Akt policlonal (cabra), anti-Nrf2 (coelho), anti-tiorredoxina-1(coelho) (Santa Cruz Biotechnology), anti-catalase (coelho), anti SOD Cu-Zn (coelho), anti-GST (coelho) (Chemicon) e anti-HNE (coelho) (Calbiochem). A seguir, as membranas foram lavadas com TTBS (três períodos de 10 minutos cada) e incubadas com o segundo anticorpo durante duas horas sob agitação constante em temperatura ambiente na diluição de 1:10.000 em TTBS. Os anticorpos secundários peroxidados utilizados foram anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology) e anti-coelho (Zymed Laboratories). Antes de proceder à revelação por quimiluminescência as membranas foram lavadas com TBS (Tris 20 mmol/L e NaCl 140 mmol/L).

A reação de quimiluminescência ocorreu por meio de sistema de detecção baseado em substratos luminescentes (luminol e ácido p-cumárico), com exposição das membranas ao filme radiográfico Hyperfilm

(Amersham) por aproximadamente 1 minuto, seguido das incubações nas soluções de revelação: revelador, ácido acético (10%) e fixador (1 minuto cada incubação). Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura.

A autorradiografia gerada foi analisada por meio de analisador e quantificador de imagem (Image Master VDS, Pharmacia Biotech). A densitometria obtida para as bandas de todos os anticorpos foi corrigida por uma banda inespecífica obtida pela coloração da membrana com Vermelho de *Ponceau* (Klein et al, 1995). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (valor percentual referente ao grupo controle ou referente ao total do gel).

#### **4.4.13 Análise Estatística**

Foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via para a análise dos resultados referentes ao experimento agudo de 6 e 24 horas e ANOVA de duas vias para a análise do tratamento crônico com DHEA em ratos com diferentes idades, utilizando-se o tratamento e a idade como fatores independentes. Foi utilizado o teste *post hoc* de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls, excetuando-se o 3º artigo (sangue) em que foi utilizado o teste *post hoc* de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância considerado para se admitir diferenças entre os grupos foi de 5% ( $P < 0,05$ ). O programa Sigma Stat 2.0 foi utilizado como ferramenta computacional para a análise dos dados. As correlações entre duas variáveis

foram calculadas utilizando o teste de Correlação de Pearson. O tamanho amostral de cada grupo está representado nas figuras referentes a cada análise. O número de animais variou entre 4 e 6 animais, com base em experimentos anteriores de nosso laboratório (Ribeiro e Garcia-Segura, 2002; Souza-Rabbo et al, 2003; Guedes et al, 2008).

## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram descritos sob a forma de artigos para a submissão em revistas internacionais indexadas. A divisão dos resultados em quatro artigos e a ordem de apresentação segue a seqüência da realização dos experimentos.

### 5.1 Artigo 1

---

**Título:** Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts

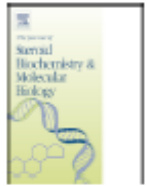
---

**Status:** Artigo publicado (Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2008, 112: 138-44)

**Objetivo:** Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de DHEA em distintas janelas temporais sobre o estresse oxidativo e sua relação com a ativação da Akt no miocárdio de ratos adultos

**Conclusão:** DHEA produziu diferenças significativas entre as diferentes janelas temporais sobre os parâmetros estudados, com uma resposta com perfil prooxidante no miocárdio dos ratos adultos.

---



## Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts

Maria H.V.M. Jacob<sup>a,b,\*</sup>, Daiane da R. Janner<sup>a</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>b</sup>, Susana F. Llesuy<sup>c</sup>, Maria F.M. Ribeiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Interação Neuro-Humoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Radicais Libres em Biologia, Cátedra de Química General y Inorgánica, Facultad de Farmacia e Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 January 2008

Received in revised form 17 May 2008

Accepted 16 September 2008

#### Keywords:

DHEA

Oxidative stress

Akt

Heart

### ABSTRACT

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an endogenous steroid synthesized mainly in the adrenal cortex. It is known that DHEA is a precursor of sex steroids and that part of its effects depends on its conversion to estrogens and androgens. Sex steroids exert profound and controversial effects on cardiovascular function. Exogenous DHEA can exert a dual effect, antioxidant or prooxidant, depending on the dose and on the tissue specificity [1,2] (F. Celebi, I. Yilmaz, H. Aksoy, M. Gümüş, S. Taysi, D. Oren, Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury in obstructive jaundice in rats, *J. Int. Med. Res.* 32 (4) (2004) 400–405; S.K. Kim, R.F. Novak, The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression, *Pharmacol. Ther.* 113 (1) (2007) 88–120). Akt signaling pathway is one of the anti-proliferative mechanisms of DHEA (Y. Jiang, T. Miyazaki, A. Honda, T. Hirayama, S. Yoshida, N. Tanaka, Y. Matsuzaki, Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone, *J. Gastroenterol.* 40 (5) (2005) 490–497). Heart homogenates were prepared to quantify lipid peroxidation (LPO), concentration of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and p-Akt/Akt ratio, and the activities of those antioxidant enzymes. When administered to male Wistar rats in short-term (6 or 24 h) intraperitoneally, DHEA produced significant differences in some parameters of oxidative stress in rat hearts among the distinct doses (1, 10, and 50 mg/kg) used. The results here presented, regarding 6 and 24 h oxidative stress status, have shown that DHEA injections promoted a prooxidant answer in healthy Wistar rat hearts.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate ester (DHEAS) are the major circulating steroid hormones produced abundantly by the mammalian adrenal cortex. The plasmatic concentrations of these steroids progressively decline with age. Many epidemiological studies have shown an inverse correlation between DHEA/DHEAS plasma concentration and mortality, with increased risks of cardiovascular disease because of DHEA's reduction with

aging [4]. A protective role of DHEA against atherosclerotic disease in rabbits [5] and primates [6] has been described. This steroid can act as a modulator of neurotransmitter receptors, such as GABAA, NMDA, and sigma 1 receptors [7,8]. It is known that DHEA is a precursor of sex steroids and that part of its effects depends on its conversion to estrogens and androgens. Sex steroids exert profound and controversial effects on cardiovascular function. Additionally, female sex steroid hormones exert multiple effects on the vascular system, decreasing the development of atherosclerosis, blocking vessel wall response to injury and inducing rapid vasodilatation [9,10]. Some steroids have been considered as antioxidants, including DHEA [11]. Exogenous DHEA can exert a dual effect, antioxidant or prooxidant, depending on the dose and on the tissue specificity [12,13]. DHEA effects on protection against oxidative stress could be through both genomic and non-genomic pathways [14]. However, the action mechanisms of

\* Corresponding author at: Laboratório de Interação Neuro-Humoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +55 5133083500; fax: +55 5133083656.

E-mail address: [mhvmjacob@hotmail.com](mailto:mhvmjacob@hotmail.com) (M.H.V.M. Jacob).

DHEA over myocardial oxidative stress are not completely understood.

Reactive oxygen species (ROS) are predominantly implicated in causing cell damage, inhibiting lipids, proteins, and DNA normal functions. They also can play an important physiological role in intracellular regulation and signaling, which involves cellular responses to noxia and the induction of mitogenic responses [15]. Cells are able to generate ROS endogenously which induce and maintain signal transduction pathways [16]. Tanaka et al. [17] demonstrated that moderate levels of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) activated the Akt and eNOS pathways, possibly through cellular oxidative stress causing conformational changes in membrane proteins. Akt is a serine/threonine kinase, which stimulates growth pathways and inhibits apoptotic cycle. The involvement of Akt in cell survival is a complex process which requires an extensive cascade of intracellular events [18]. Such pathway has also been implicated in regulating physiological cardiac growth and increased cardiac function [19]. Akt signaling pathway is one of the anti-proliferative mechanisms of DHEA [3].

Millions of people in the United States and Europe continue to use DHEA (mostly without medical care) as a product to cope with various physiological deficiencies or as a promise of anti-aging effects [20]. Another important issue to consider is that DHEA is also used at pharmacological or supraphysiological doses by athletes and fitness apprentices for muscle building purposes [21].

Since great controversial in this subject still remains and no sufficient data are available in the literature to support its recommendation, it is indispensable to better understand DHEA's role in oxidative stress and redox regulation of cell survival pathways.

Thus, the aim of this study was to test the short-term (6 and 24 h) effect of different DHEA concentrations in some oxidative stress markers in myocardium and its relationship to Akt activation.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and treatments

Forty-eight Wistar male rats obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul were randomly assigned into 6 h ( $n=24$ ) or 24 h ( $n=24$ ) DHEA treatment groups or control. Animals were housed in plastic cages (four animals in each) and received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12-h light/dark cycle). Special care was taken to minimize the number of animals used and their suffering. Adult animals (approximately 250–300 g) were injected intraperitoneally with 1, 10, or 50 mg/kg of DHEA (Sigma) or with vehicle (30%  $\beta$ -cyclodextrin; Fluka). Six or 24 h after the injections, animals were killed by decapitation and their hearts were quickly removed. Left ventricle tissue (approximately 100 mg) was frozen on dry ice and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for Western blotting. Remaining heart tissue was used to measure enzyme activities and it was homogenized in an Ultra-Turrax homogenizer (Staufen, Germany) with KCl 1.15% (5 mg/g tissue) and PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) (10 mmol/L). Homogenate was centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min, between 0 and 4 °C (Sorval RC 58-rotor SM24, Du Pont Instruments, EJA). The supernatant was frozen and later used for enzyme activity assays [22].

### 2.2. Lipid peroxidation

Chemiluminescence (CL) was utilized to evaluate lipid peroxidation (LPO). CL was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spec-

trometer 1215, LKB-Produkter AB, Sweden). Heart homogenates were placed in low-potassium vials at a protein concentration of 0.5–1.0 mg of protein/mL in a reaction medium consisting of 120 mmol/L KCl, 30 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4). Measurements were started by the addition of 3 mmol/L *tert*-butyl hydroperoxide and the data expressed as counts per second per milligram of protein [23].

### 2.3. Antioxidant enzyme activities

Superoxide dismutase (SOD) activity, expressed as units per milligram of protein, is based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol [24]. SOD activity is determined by measuring the velocity of oxidized pyrogallol formation. The reaction medium contained Tris buffer (50 mmol/L, pH 8.2), pyrogallol (24 mmol/L), and catalase (CAT, 30 mmol/L). Absorbance changes were observed at 420 nm for 2 min.

CAT activity was determined by following the decrease in 240 nm absorption in a reaction medium containing 50 mmol/L phosphate buffer (pH 7.2), and 10 mmol/L  $H_2O_2$  [25]. It was expressed as picomole of  $H_2O_2$  reduced per minute per milligram of protein.

Glutathione-S-transferase (GST) activity, expressed as picomole per milligram of protein, was measured by the rate formation of dinitrophenol-S-glutathione at 340 nm. The reaction medium consisted of 19 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 6.5), 1 mmol/L GSH, and 1 mmol/L chloride dinitrobenzene [26].

### 2.4. Western blotting

Left ventricle samples were homogenized (Ultra-Turrax) with lysis buffer (NP40), pH 7.4, proportionally to weight (20 mL/g of tissue) with leupeptin and aprotinin. After protein measurement [27], sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (8–12%) was carried out using a miniprotein system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with broad range molecular weight standards (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA). Protein (90  $\mu\text{g}$ ) was loaded in each lane with loading buffer containing 0.375 mol/L Tris (pH 6.8), 50% glycerol, 10% SDS, 0.5 mol/L dithiothreitol, and 0.002% bromophenol blue. Samples were heated at 90 °C for 2 min before gel loading. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond, Amersham) by using an electrophoretic transfer system. The membranes were then incubated with 8% nonfat dry milk in TTBS for 60 min (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 150 mmol/L NaCl; 0.05% Tween-20, pH 7.4). The membranes were incubated over night at 4 °C with the primary antibodies diluted in TTBS plus 2.5% bovine serum albumin (BSA). Rabbit polyclonal antibodies for Cu-Zn SOD (15 kDa), CAT (65 kDa), GST (26 kDa; Chemicon), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE, 75 kDa; Calbiochem), and p-Akt (ser 473) (60 kDa) and Akt (60 kDa) (Santa Cruz Biotechnology) were used. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 2 h at room temperature with secondary antibody (goat anti-rabbit horse peroxidase conjugate), and washed with TBS (20 mmol/L Tris-HCl; 150 mmol/L NaCl, pH 7.5). After chemiluminescence ECL apposition of the membranes to autoradiographic films (Hyperfilm ECL, Amersham), those were analyzed using Image Master VDS Software version. The results from each membrane were normalized to the Ponceau values (5% in acetic acid). To minimize interassay variations, samples from all experimental groups were processed in parallel ( $n=4$  in each group).

### 2.5. Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry et al. [28], using BSA as standard. The results were expressed in mg of protein/mL.



**Table 1**

Myocardial marker of oxidative damage to membrane lipids (chemiluminescence) and antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) in cardiac homogenates from the different groups after 6 h treatment.

Parameter/group	Control	1 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg
Chemiluminescence (cps/mg protein $\times 10^2$ ), n=6	51.76 $\pm$ 10.83	87.62 $\pm$ 6.23*	102.60 $\pm$ 16.77*	77.91 $\pm$ 22.75
SOD (U/mg protein), n=6	2.94 $\pm$ 0.44	3.99 $\pm$ 0.61*	4.22 $\pm$ 0.25*	4.42 $\pm$ 0.56*
CAT (pmol/mg protein), n=6	61.80 $\pm$ 14.40	52.10 $\pm$ 5.87	52.32 $\pm$ 14.98	49.17 $\pm$ 5.17
GST (nmol/min/mg protein), n=6	1.08 $\pm$ 7.18	25.75 $\pm$ 2.93	19.98 $\pm$ 4.74	21.97 $\pm$ 4.78

Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

\* Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

**Table 2**

Myocardial marker of oxidative damage to membrane lipids (chemiluminescence) ( $p = 0.6624$ ) and antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) in cardiac homogenates from the different groups after 24 h treatment.

Parameter/group	Control	1 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg
Chemiluminescence (cps/mg protein $\times 10^2$ ), n=6	64.01 $\pm$ 9.69	70.28 $\pm$ 12.73	70.83 $\pm$ 3.72	64.06 $\pm$ 16.54
SOD (U/mg protein), n=6	3.22 $\pm$ 0.89	3.42 $\pm$ 0.77	1.88 $\pm$ 0.55*	2.76 $\pm$ 0.68
CAT (pmol/mg protein), n=6	55.27 $\pm$ 12.04	71.98 $\pm$ 14.85	56.20 $\pm$ 13.50	54.02 $\pm$ 11.61
GST (nmol/min/mg protein), n=6	17.70 $\pm$ 1.56	15.86 $\pm$ 2.65	27.55 $\pm$ 6.61*	25.28 $\pm$ 3.48*

Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

\* Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

In Western blot analysis, protein was measured by the method of Bradford [27].

### 2.6. Data analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. and compared using one-way ANOVA complemented with Student–Newman–Keuls test. The correlation between two variables was analyzed by Pearson's correlation. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Lipid peroxidation

Table 1 shows LPO measured through CL in heart homogenates of groups after 6 h treatment. Groups 1 mg/kg (87.62  $\pm$  6.23 cps/mg protein  $\times 10^2$ ) and 10 mg/kg (102.60  $\pm$  16.77 cps/mg protein  $\times 10^2$ ) were 69% and 98% higher, respectively, than control (51.76  $\pm$  10.83 cps/mg protein  $\times 10^2$ ).

Table 2 presents data from the same parameter (CL) measured in heart homogenates of groups after 24 h treatment. There was no statistical difference between those groups.

### 3.2. Antioxidant enzyme activities

Table 1 also presents the antioxidant enzyme activities of SOD, CAT, and GST in heart homogenates after 6 h treatment. In all DHEA dosage groups (1, 10, and 50 mg/kg), SOD activity was increased (35%, 43%, and 50%, respectively) as compared with that in the control group. No changes occurred between groups in CAT or GST activities.

Yet, Table 2 shows the activities of the antioxidant enzymes in cardiac homogenates after 24 h treatment. SOD activity was significantly decreased by 42% in the 10 mg/kg group as compared with that in the control group. In groups 10 and 50 mg/kg, GST activity was increased 55% and 43%, respectively, as compared with that in the control.

### 3.3. Western blotting

Protein expression values were expressed as arbitrary densitometric units considering control group 100%. SOD, CAT, and GST

concentration were not significantly different between groups after 6 h ( $p = 0.4298$ ,  $p = 0.8543$ , and  $p = 0.227$  respectively) (Fig. 1A, B, and C) or 24 h treatment ( $p = 0.9911$ ,  $p = 0.0601$ , and  $p = 0.329$ , respectively) (Fig. 2A, B, and C). Also HNE concentration, an indicator of protein damage, was not significantly different between groups in any of temporal windows treatments (6 h treatment,  $p = 0.3324$ ; 24 h treatment,  $p = 0.1244$ ) (Figs. 1D and 2D, respectively). The Akt concentration relation ( $p$ -Akt/Akt) was also not different between groups after 6 h ( $p = 0.624$ ) (Fig. 1E). However, after 24 h Akt concentration relation was significantly enhanced in 50 mg/kg group (47%) when compared to control ( $p = 0.033$ ) (Fig. 2E). After 24 h treatment Akt concentration was positively correlated with HNE concentration ( $r = 0.75$ ,  $p = 0.0008$ ).

## 4. Discussion

Several studies have indicated a potential chemo-preventive role of DHEA in important human diseases. Decreased serum levels of DHEA and DHEAS have been positively correlated with increased risks of developing cancer and cardiovascular disease [29] and epidemiological evidences in human and animal studies suggest that DHEA may have cardioprotective properties [30]. One example of its possible dual action regarding to oxidative stress balance is that DHEA can act as a peroxisome proliferator and carcinogen in the liver of rodents [21]. However, results considering DHEA and myocardial oxidative stress have not yet demonstrated any conclusive effects.

This study examined, in male Wistar rat hearts, the *in vivo* effect of DHEA administered intraperitoneally (1, 10, or 50 mg/kg b.w.) for 6 or 24 h in terms of oxidative stress and Akt pathway signaling.

Our results showed that there are selective changes between the two time points of DHEA administration in the parameters of oxidative stress status analyzed in healthy rat hearts.

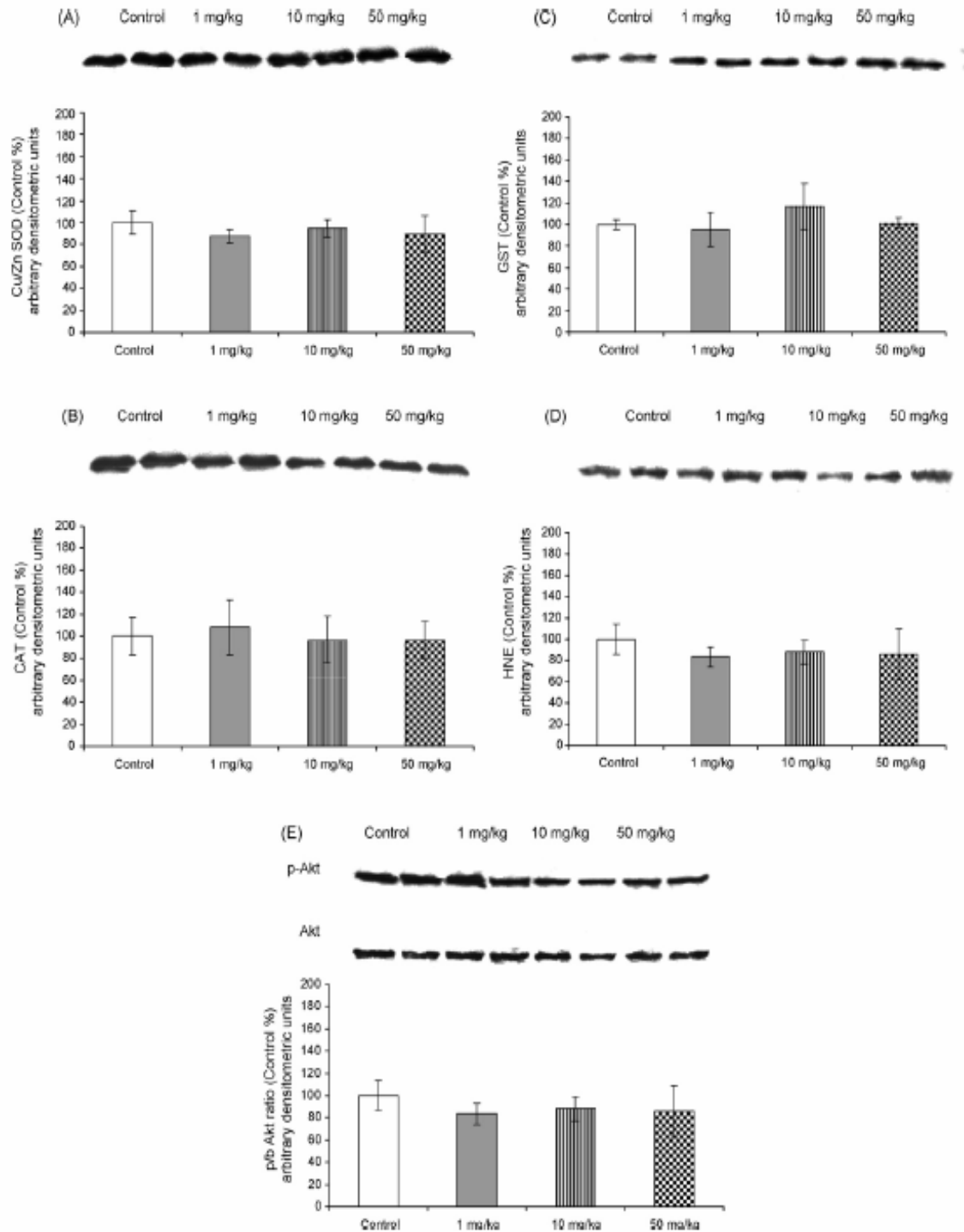
Some authors have already demonstrated that the temporal administration can play an important role regarding DHEA and oxidative stress. Aksoy et al. [31] have shown that DHEA (50 mg/kg) may have a beneficial effect on renal tissue against oxidative stress when administered 3 h prior to ischemia–reperfusion injury in rabbits, preventing decreases in SOD and CAT activities. However, after 2 days of 50 mg/kg, Pelissier et al. [32] did not demonstrate any antioxidant effect of DHEA in colon, small intestine, or liver



homogenates of healthy male Wistar rats. But, in the same study, after 7 days of the same DHEA dosage, oxidative stress products were decreased in these studied organs.

Lipid peroxidation serves as a marker of oxidative damage. CL is a very sensitive assay (as are all the chemiluminescent techniques) where an organic hydroperoxide is added to the sample

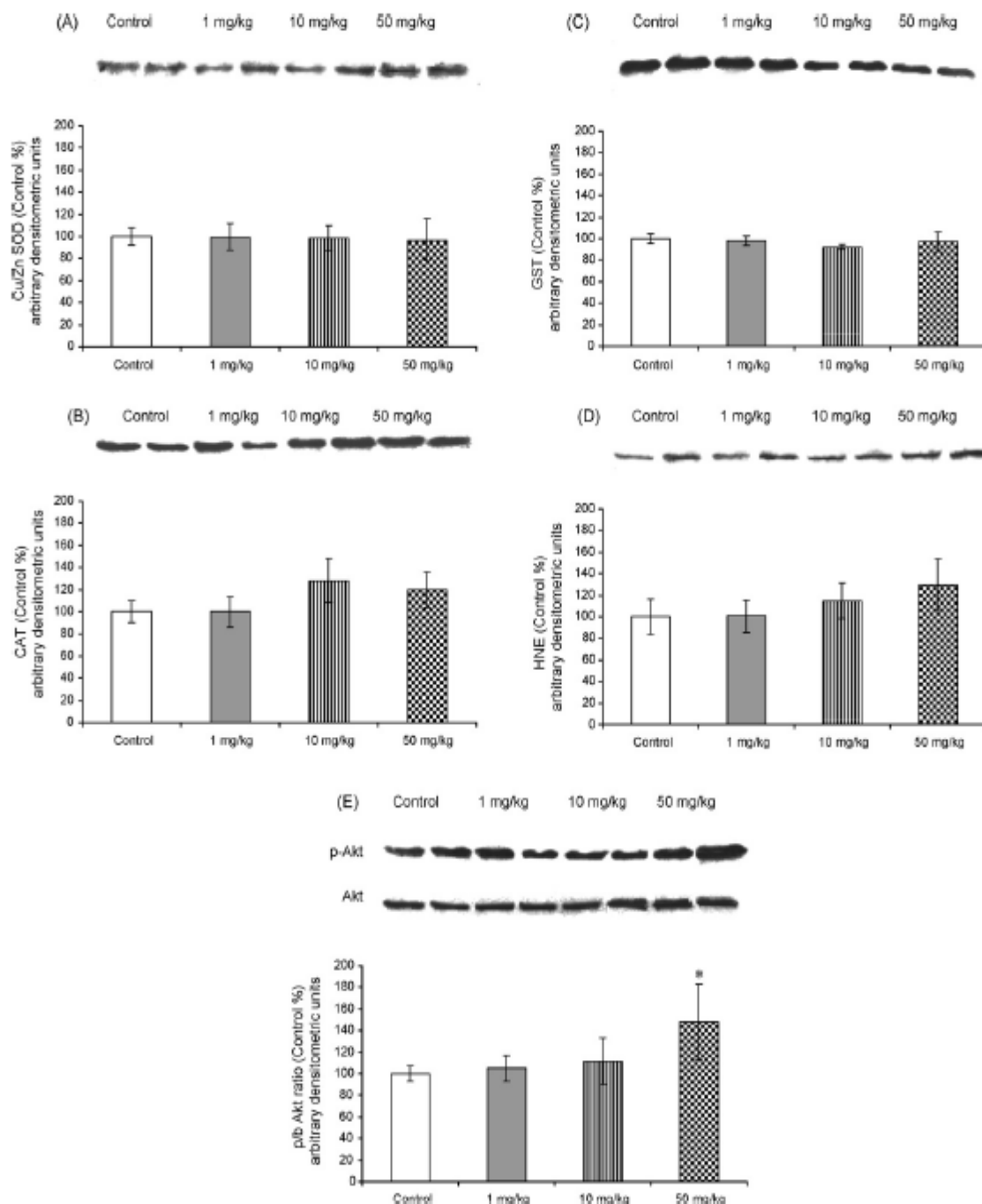
and can react with its hemoproteins. As a result, the initiation of chain reactions of lipid peroxidation occurs. Increased LPO may be a result of a higher ROS production. Our results have shown that 1 and 10 mg/kg b.w. DHEA injections promoted a prooxidant answer in adult male Wistar rat hearts, because of the increased myocardial oxidative damage to membrane lipids (69% and 98%,



**Fig. 1.** Western blot analysis in cardiac homogenates after 6h treatment using (A) Cu-Zn SOD, (B) CAT, (C) GST, (D) HNE antibodies, and (E) the relation between p-Akt/Akt expression, followed by representative Western blots (two for each group). Data as mean  $\pm$  S.D. from four animals in each group. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. in control percent. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

respectively) when compared to control group after 6 h treatment. As shown in Table 1, there was a significant increase in lipid peroxides after 6 h DHEA treatment in 1 and 10 mg/kg groups ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively), although no change was observed after 24 h DHEA treatment groups compared to control (Table 2). The enhanced SOD activity could reflect an enhancement of superoxide radical concentration 6 h after DHEA administration, despite we

have not measured this specie individually. It seems that 24 h after DHEA injection, superoxide radical concentration decreases since SOD activity decreased by 42% in group 10 mg/kg when compared to control. Another antioxidant defense (GST) has raised (56% and 43%, in 10 and 50 mg/kg groups compared to control, respectively) after 24 h. GSTs are a family of enzymes that utilize glutathione in reactions adding to transform a range of distinct compounds (car-



**Fig. 2.** Western blot analysis in cardiac homogenates after 24 h treatment using (A) Cu-Zn SOD, (B) CAT, (C) GST, (D) HNE, and (E) the relation between p-Akt/Akt expression, followed by representative Western blots (two for each group). Data as mean  $\pm$  S.D. from four animals in each group. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. in control percent. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test. \*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

cinogens, therapeutic drugs, and products of oxidative stress) [33]. After 24 h treatment, GST enhanced its activity in order to detoxify lipid peroxidation products, indicating that oxidative stress is still high since GST activity is quite activated. Thus, the observed effects probably are not directly related to DHEA elimination, but with the time-dependent oscillation of ROS production and metabolization. In 6 h, GST activity is not altered, but SOD activity is enhanced, indicating a higher superoxide anion production. This ROS can lead to the formation of hydroxyl radical, culminating in an enhanced LPO (as seen by CL data). After 24 h, GST activity is increased (in doses of 10 and 50 mg/kg). This fact taken together with a reduced SOD activity (indicating a minor superoxide anion concentration) would lead to a reduced oxidative damage (CL), as observed in the dose of 10 mg/kg. The overall results indicate that initially the superoxide anion probably is the ROS that is augmented (6 h). In consequence, lipid peroxidation products will prevail demanding an adaptive answer of GST (24 h) in order to avoid oxidative damage. This is suggestive that in short-term DHEA has a prooxidant effect that reduces antioxidant systems.

The protein expression of the antioxidant enzymes were not modified between such groups (6 or 24 h treatment) probably because the ROS generated would not be sufficient to modify protein synthesis; however, these were efficient to change some antioxidant activities. Probably there are other intracellular factors influencing the concentration of these antioxidant enzymes, such as substrate source and temperature, which we have not considered as a goal.

Increased ROS production can also be detected by some markers of lipid peroxidation, as well as HNE, a major aldehydic end-product of lipid peroxidation. HNE is an indicator of lipids and proteins oxidation once reacting with the amino acids cysteine, histidine, and lysine forming Michael adducts [34]. HNE is expected to react with not only cell membrane proteins but also with intracellular elements, such as glutathione (GSH) [35]. In this study, HNE concentration was not significantly different between groups in any of temporal windows treatments.

There is evidence that DHEA can act as a survival factor for endothelial cells by triggering the Galphai-PI3K/Akt-Bcl2 pathway to protect bovine aortic endothelial cells against apoptosis. This vascular protective effect of DHEA resulted in rapid and dose-dependent phosphorylation of Akt [36]. Another *in vitro* study explored the anti-proliferative mechanisms of DHEA in human hepatoblastoma cells. The induction of apoptosis through the inhibition of Akt signaling pathway was observed after incubation for 24 h with 100 and 200  $\mu\text{mol/L}$  DHEA treatments [3]. Activated Akt overexpression in some mouse tissues leads to organ enlargement. Akt protein, when activated, phosphorylate a range of intracellular substrates that regulate growth, metabolism, and survival [19]. Since Akt is a serine/threonine kinase and a number of studies reported that the serine/threonine kinases can be regulated by oxidants [15], it is of great interest to study the possible relation between DHEA, Akt, and oxidative stress.

In our study, after 24 h, the 50 mg/kg DHEA treatment resulted in elevation (47%) in protein levels of p-Akt/Akt ratio, evaluated by Western blot as compared to control ( $p < 0.05$ ; Fig. 2E). Moreover, we have found a positive correlation between pAkt/Akt ratio and HNE-Michael adducts after 24 h of DHEA treatment ( $r = 0.75$ ,  $p = 0.0008$ ). Thus, this parallel relation could mean that HNE reacts with some important intracellular proteins which influence the Akt signaling pathway resulting in a protective role of Akt. The damaging scene designed by HNE is accompanied by Akt potential to scavenge such ROS, reflecting Akt's protective potential. This is suggestive that increased LPO products (evaluated by HNE) would induce Akt phosphorylation, which is a survival signaling pathway. Wang et al. have described that ROS such as  $\text{H}_2\text{O}_2$  are stimulants

for Akt phosphorylation and this generates a signal to protect cells against oxidative stress [37]. Guedes et al. demonstrated that ROS are involved in neuropathic pain developed in a rat model of painful stimulation via sciatic nerve axotomy, which causes activation of Akt and also does not change HNE expression after 24 h. Interestingly, in the same time point we have seen the same effect, corroborating our results [38]. Cai et al. also have shown that Akt phosphorylation can be mediated by ROS, such as hydrogen peroxide [39]. Previous data of our group have demonstrated a role for oxidative stress in myocardial hypertrophic answer by activating IGF-IR (insuline-like growth factor 1 receptor), which is a regulator of cellular growth and development [40].

It would be interesting to follow downstream the signaling pathway of Akt since that the expression of many different proteins would be influenced by this serine/threonine kinase. However, our main goal was to elucidate if a redox signaling of Akt would be taking place after DHEA short-term administration in the heart. Further studies will contribute to establish the role of this signaling pathway in different pathologic conditions in which oxidative stress is involved.

The results here presented, regarding 6 and 24 h oxidative stress status, reinforce how necessary is establishing more accurate protocols of DHEA treatment, in order to warrant the beneficial effects and to avoid the harmful ones. In the literature, there is a huge diversity of protocols used concerning time and dose administrated, and it militates against a meaningful assessment of the net effect of DHEA.

Whether or not the modified oxidative stress scenario found in this acute DHEA administration is linked to the adverse health effects related to its chronic and free use – in which oxidative damage can play a pathophysiological role – is an attractive hypothesis that warrants further investigation.

## Acknowledgements

This work was supported by CNPq, CAPES, and FAPERGS (Brazilian Research Agencies).

## References

- [1] F. Celebi, I. Yilmaz, H. Aksoy, M. Gümüş, S. Taysi, D. Oren, Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury in obstructive jaundice in rats, *J. Int. Med. Res.* 32 (4) (2004) 400–405.
- [2] S.K. Kim, R.F. Novak, The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression, *Pharmacol. Ther.* 113 (1) (2007) 88–120.
- [3] Y. Jiang, T. Miyazaki, A. Honda, T. Hirayama, S. Yoshida, N. Tanaka, Y. Matsuzaki, Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone, *J. Gastroenterol.* 40 (5) (2005) 490–497.
- [4] T. Simoncini, P. Mannella, L. Fornari, G. Varone, A. Caruso, A.R. Genazzani, Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms, *Endocrinology* 144 (8) (2003) 3449–3455.
- [5] D.M. Eich, J.E. Nestler, D.E. Johnson, G.H. Dworkin, D. Ko, A.S. Wechsler, M.L. Hess, Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with dehydroepiandrosterone in the heterotopic rabbit model of cardiac transplantation, *Circulation* 87 (1) (1993) 261–269.
- [6] J. Christopher-Hennings, I.D. Kurzman, A.L. Haffa, J.W. Kemnitz, E.G. Macewen, The effect of high fat diet and dehydroepiandrosterone (DHEA) administration in rhesus monkey, *In Vivo* 9 (5) (1995) 415–420.
- [7] M. Schumacher, Y. Akwa, R. Guennoun, F. Robert, F. Labombarda, F. Désarnaud, P. Robel, A.F. De Nicola, E.E. Baulieu, Steroids synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects, *J. Neurocytol.* 29 (2000) 307–326.
- [8] E.E. Baulieu, P. Robel, Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 1089–1091.
- [9] J. Arnlöv, M.J. Pencina, S. Amin, B.H. Nam, E.J. Benjamin, J.M. Murabito, T.J. Wang, P.E. Knapp, R.B. D'Agostino Sr., S. Bhasin, R.S. Vasan, Endogenous sex hormones and cardiovascular disease incidence in men, *Ann. Intern. Med.* 145 (3) (2006) 176–184.



- [10] K.T. Khaw, Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulphate and cardiovascular disease, *J. Endocrinol.* 150 (1996) S149–S153.
- [11] M. Yoshimura, Cardiac aldosterone, *Nippon Rinsho* 64 (5) (2006) 837–842.
- [12] A.H. Goldfarb, M.K. McIntosh, B.T. Boyer, Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats, *J. Appl. Physiol.* 80 (2) (1996) 486–490.
- [13] R. Mastrocola, M. Aragno, S. Betteto, E. Brignardello, M. Catalano, O. Danni, G. Boccuzzi, Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation, *Life Sci.* 73 (3) (2003) 289–299.
- [14] T. Simoncini, A.R. Genazzani, Non-genomic actions of sex steroids hormones, *Eur. J. Endocrinol.* 148 (2003) 281–292.
- [15] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84.
- [16] W. Dröge, The plasma redox state and ageing, *Ageing Res. Rev.* 1 (2) (2002) 257–278.
- [17] T. Tanaka, H. Nakamura, J. Yodoi, E.T. Bloom, Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (9) (2005) 1231–1242.
- [18] C.J. Mullonkal, L.H. Toledo-Pereyra, Akt in ischemia and reperfusion, *J. Invest. Surg.* 20 (3) (2007) 195–203.
- [19] B. DeBosch, I. Treskov, T.S. Lupu, C. Weinheimer, A. Kovacs, M. Courtois, A.J. Muslin, Akt1 is required for physiological cardiac growth, *Circulation* 113 (17) (2006) 2097–2104.
- [20] C. Kibaly, L. Meyer, C. Patte-Mensah, A.G. Mensah-Nyagan, Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord, *FASEB J.* 22 (1) (2008) 93–104.
- [21] F. Labrie, V. Luu-The, C. Martel, A. Chernomoretz, E. Calvo, J. Morissette, C. Labrie, Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 100 (2006) 52–58.
- [22] S.F. Llesuy, J. Milei, H. Molina, A. Boveris, S. Milei, Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin mice, *Tumori* 71 (1985) 241–249.
- [23] B. Gonzalez-Flecha, S.F. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 93–100.
- [24] S.L. Marklund, Pyrogallol autoxidation, in: R.A. Greenwald (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, pp. 243–247.
- [25] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [26] B. Mannervick, C. Gluthenberg, Glutathione transferase (human placenta), *Methods Enzymol.* 77 (1981) 231–235.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [28] O.H. Lowry, A.L. Rosebrough, A.L. Farr, R. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [29] S.A. Khan, Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on ubiquinone and catalase in the livers of male F-344 rats, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (7) (2005) 1301–1303.
- [30] O. López, A.F. Hernández, L. Rodrigo, F. Gil, G. Pena, J.L. Serrano, T. Parrón, E. Villanueva, A. Pla, Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides, *Toxicol. Lett.* 171 (3) (2007) 146–153.
- [31] Y. Aksoy, T. Yapanoglu, H. Aksoy, A.K. Yildirim, The effect of dehydroepiandrosterone on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rabbits, *Urol. Res.* 32 (3) (2004) 93–96.
- [32] M.A. Pelissier, C. Trap, M.I. Malewiak, R. Morfin, Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7- $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver, *Steroids* 69 (2004) 137–144.
- [33] A. Pastore, G. Federici, E. Bertini, F. Piemonte, Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, *Clin. Chim. Acta* 333 (1) (2003) 19–39.
- [34] K. Uchida, 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress, *Prog. Lipid Res.* 42 (4) (2003) 318–343.
- [35] I. Nakashima, W. Liu, A.A. Akhand, K. Takeda, Y. Kawamoto, M. Kato, H. Suzuki, 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions, *Mol. Aspects Med.* 24 (4–5) (2003) 231–238.
- [36] D. Liu, H. Si, K.A. Reynolds, W. Zhen, Z. Jia, J.S. Dillon, Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression, *Endocrinology* 148 (7) (2007) 3068–3076.
- [37] X. Wang, K.D. McCulloch, T.F. Franke, N.J. Holbrook, Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival, *J. Biol. Chem.* 275 (19) (2000) 14624–14631.
- [38] R.P. Guedes, A.S.R. Araujo, D. Janner, A. Belló-Klein, M.F. Ribeiro, W.A. Partata, Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2008, doi:10.1007/s10571-008-9279-9.
- [39] H. Cai, Z. Li, M.E. Davis, W. Kanner, D.G. Harrison, S.C. Dudley, Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide, *Mol. Pharmacol.* 63 (2003) 325–331.
- [40] A.S. Araujo, A.T. Enzweiler, P. Schenkel, T.R. Fernandes, M.F. Ribeiro, W.A. Partata, S. Llesuy, A. Belló-Klein, Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine, *Mol. Cell. Biochem.* 303 (1–2) (2007) 89–95.

## 5.2 Artigo 2

---

**Título:** DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in aged rats

---

**Status:** Artigo publicado (Steroids 2009, 74: 1045-50)

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da administração crônica de DHEA sobre o estresse oxidativo e sua relação com a ativação da Akt no miocárdio de ratos adultos jovens e velhos

**Conclusão:** DHEA produziu aumento na fosforilação da Akt e diminuiu a atividade da SOD nas duas idades estudadas. A ativação da via da Akt parece estar relacionada com mudanças nos parâmetros de estresse oxidativo, de acordo com a idade investigada.

---



## DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in aged rats

Maria Helena Vianna Metello Jacob<sup>a,b,\*</sup>, Daiane da Rocha Janner<sup>a,1</sup>, Matheus Parmegiani Jahn<sup>c,2</sup>, Luiz Carlos Rios Kucharski<sup>c,2</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>b,3</sup>, Maria Flavia Marques Ribeiro<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Interação Neuro-Humoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 April 2009

Received in revised form 11 August 2009

Accepted 12 August 2009

Available online 20 August 2009

#### Keywords:

DHEA

Aging

Heart

Oxidative stress

Akt

### ABSTRACT

The secretion of DHEA-synthesized mainly in the adrenal cortex—increases in the postnatal aging, peaks in the twenties and decreases with age afterwards. Exogenous DHEA can exert a dual effect depending on dose and on tissue. Akt is a serine/threonine kinase whose activity has been seen as an interventional approach for cardiomyopathic damage resulting from aging changes. In order to evaluate DHEA effects over myocardial Akt protein expression associated to oxidative stress markers during aging, male Wistar rats (3 and 18 months) were assigned into two groups: control or DHEA (10 mg/kg, subcutaneously, for 5 weeks). In the aged group, we found increased lipid peroxidation and glutathione-S-transferase activity. DHEA produced an increase in p-Akt protein expression and a decrease in SOD activity in both ages. Akt pathway activation might be related to changes in oxidative stress parameters according to age.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate ester (DHEAS) are the major circulating steroid hormones, which are produced abundantly by the mammalian adrenal cortex. Levels of DHEA and DHEAS are maximal between the second and third decades of life, then start to decline 2% per year [1]. DHEA declination associated with age may lead to autoimmune diseases, sexual dysfunction, osteoporosis, deterioration of lipid metabolism, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases [2]. The development and occurrence of cardiovascular and cerebrovascular diseases are related to aging [3]. These observations suggest that the restora-

tion of DHEA to young adult levels may have beneficial effects on age-related conditions.

Epidemiological studies have shown that atherosclerotic disease and cardiovascular mortality are inversely associated with concentrations of DHEA and DHEAS, mainly in males [4,5]. DHEA therapy (150 mg daily) during 40 days decreased total cholesterol concentration, insulin and glucose levels in men with low DHEA levels, showing a beneficial effect reducing coronary heart disease risk factors [6]. The incidence and prevalence of atherothrombotic diseases, as stroke and coronary heart disease, increase with aging [7]. Important studies have shown association between aging and biochemical modifications in the arterial wall and in lipoproteins [8,9] and in hormonal status including DHEA [10,11], which might be related to the increased incidence of coronary heart disease. Since DHEA secretion exhibits an age-associated pattern, which is characterized by declining with aging, this steroid has generated major interest as an “anti-aging” hormone [12].

Some steroids have been considered as antioxidants, including DHEA [13,14]. Effects of exogenous DHEA administration can be dual, antioxidant or prooxidant, depending on the dosage used and on the tissue specificity [15,16]. Gallo et al. [17] in an *in vitro* experiment (Chang liver cells), pointed that slightly higher concentrations of DHEA (0.1 μmol/l) – above those found in human tissues – pro-

\* Corresponding author at: Laboratório de Interação Neuro-Humoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +55 51 33083500; fax: +55 51 33083453.

E-mail addresses: mhvmjacob@hotmail.com (M.H.V.M. Jacob),

daia.janner@yahoo.com.br (D. da Rocha Janner), matheusjahn@hotmail.com (M.P. Jahn), kuchars@ufrgs.br (L.C.R. Kucharski), belklein@ufrgs.br (A. Belló-Klein), mflavia@ufrgs.br (M.F.M. Ribeiro).

<sup>1</sup> Tel.: +55 51 33083500.

<sup>2</sup> Tel.: +55 51 33083505.

<sup>3</sup> Tel.: +55 51 33083621.



tected cells against LPO induced by oxidative stress (cells received cumene hydroperoxide 0.5 mmol/l, a prooxidant stimulus). However, at pharmacological doses (10–50  $\mu$ mol/l), DHEA displayed a prooxidant activity.

The altered ROS production may induce oxidative stress in the failing heart and vascular tree [18]. ROS contribute to cardiac injury by oxidizing cellular constituents and/or by reducing nitric oxide (NO) bioavailability [19]. ROS have also an important physiological role in the intracellular regulation and signaling [20], by inducing and/or maintaining signal transduction pathways [21]. It has been shown that moderate levels of hydrogen peroxide may activate the Akt/eNOS pathways, suggesting that oxidative stress can cause changes in proteins, influencing the regulation of signal transduction [22]. Akt is a serine/threonine kinase, which inhibits apoptotic cycle and stimulates growth pathways [23]. Such pathway seems to be involved in the regulation of cardiac growth and increased cardiac function [24]. The transition from cardiac hypertrophy to advanced heart failure in human hearts is accompanied by a huge increase in Akt phosphorylation [25].

Considered only as a dietary supplement in the US, DHEA is widely used in humans, commonly in hormonal replacement therapy [26]. Also DHEA is used at pharmacological or supra-physiological doses by athletes and fitness apprentices for muscle building purposes [27]. Additional studies are necessary to better understand this "youth" hormone's role in aging, oxidative stress and redox regulation of cell survival pathways. The main goal of the present study was to investigate chronic DHEA administration effects over aging rat hearts regarding to Akt activation and its relations to some oxidative stress parameters.

## 2. Experimental

### 2.1. Animals and treatments

Twenty-four Wistar male rats (3 and 18 months) obtained from the Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) were randomly assigned into control or DHEA (dehydroepiandrosterone; Calbiochem) (10 mg/kg) treated once a week, subcutaneously, for 5 weeks. Control groups received vehicle (vegetal oil). DHEA administration protocol was based on other studies [28,29]. DHEA plasma concentrations were measured by our group (unpublished data) over the time course of 1, 4 and 7 days after a single dose (10 mg/kg). DHEA levels were maintained until the 7th day, justifying the weekly treatment, the adequate vehicle and quantity to be injected. Animals were housed in plastic cages (four animals in each) and received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12 h light/dark cycle). After 5 weeks, animals were killed by decapitation and their hearts were quickly removed. We have used transversal slices of the entire heart (left+right chambers). Heart tissues (approximately 100 mg) was frozen on dry ice and stored at –80 °C for Western Blotting. Remaining heart tissue was used to measure enzyme activities and it was homogenized in an Ultra-Turrax homogenizer (Staufen, Germany) with KCl 1.15% (5 mg/g tissue) and PMSF (phenyl methyl sulphonyl fluoride) (10 mmol/l). Homogenate was centrifuged at 3000  $\times$  g for 10 min, between 0 and 4 °C (Sorval RC 5B-rotor SM24, Du Pont Instruments, EUA). The supernatant was frozen and later used for enzyme activity assays [30]. Special care was taken to minimize the number of animals used and their suffering. All animal procedures used in this study were in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (COBEA, Brazilian College of Animal Experimentation) and the

experimental protocol was approved by UFRGS Animal Care Committee.

### 2.2. Lipid peroxidation

Chemiluminescence (CL) was utilized to evaluate lipid peroxidation (LPO). CL was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB – Produkter AB, Sweden). Heart homogenates were placed in low-potassium vials at a protein concentration of 0.5–1.0 mg of protein/ml in a reaction medium consisting of 120 mmol/l KCl, 30 mmol/l phosphate buffer (pH 7.4). Measurements were started by the addition of 3 mmol/l tert-butyl hydroperoxide and the data expressed as counts per second per milligram of protein [31].

### 2.3. Antioxidant enzyme activities

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by measuring the velocity of oxidized pyrogallol formation. SOD activity, expressed as units per milligram of protein, is based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol [32]. The reaction medium contained Tris buffer (50 mmol/l, pH 8.2), pyrogallol (24 mmol/l), and catalase (CAT, 30 mmol/l). Absorbance changes were observed at 420 nm for 2 min.

Catalase activity was determined by following the decrease in 240 nm-absorption in a reaction medium containing 50 mmol/l phosphate buffer (pH 7.2), and 10 mmol/l hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [33]. It was expressed as picomole of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced per minute per milligram of protein.

Glutathione-S-transferase (GST) activity, expressed as picomole per milligram of protein, was measured by the rate formation of dinitrophenol-S-glutathione at 340 nm. The reaction medium consisted of 19 mmol/l sodium phosphate buffer (pH 6.5), 1 mmol/l GSH, and 1 mmol/l chloride dinitrobenzene [34].

### 2.4. Western blotting

Heart samples were homogenized (Ultra-Turrax) with lysis buffer, pH 7.4, proportionally to weight (20 ml/g of tissue). Electrophoresis and protein transference were performed as described elsewhere [35,36]. The membranes were processed for immunodetection using rabbit polyclonal antibodies for CAT (65 kDa) GST (26 kDa) (Chemicon), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (75 kDa) (Calbiochem) p-Akt (ser 473) (60 kDa) and Akt (60 kDa) (Santa Cruz Biotechnology). The bound primary antibodies were detected using goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate secondary antibody and membranes were revealed for chemiluminescence. The autoradiographies generated were quantitatively analyzed for the protein levels with an image densitometer (Imagemaster VDS Cl, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (Rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). The results from each membrane were normalized to the Ponceau values (5% in acetic acid) instead of using actin or tubulin as control, once DHEA could alter cytoskeleton proteins [37]. To minimize interassay variations, samples from all experimental groups were processed in parallel ( $n=4$  in each group).

### 2.5. Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry et al. [38], using BSA as standard. The results were expressed in mg of protein/ml. In Western blot analysis, protein was measured by the method of Bradford [39].

**Table 1**

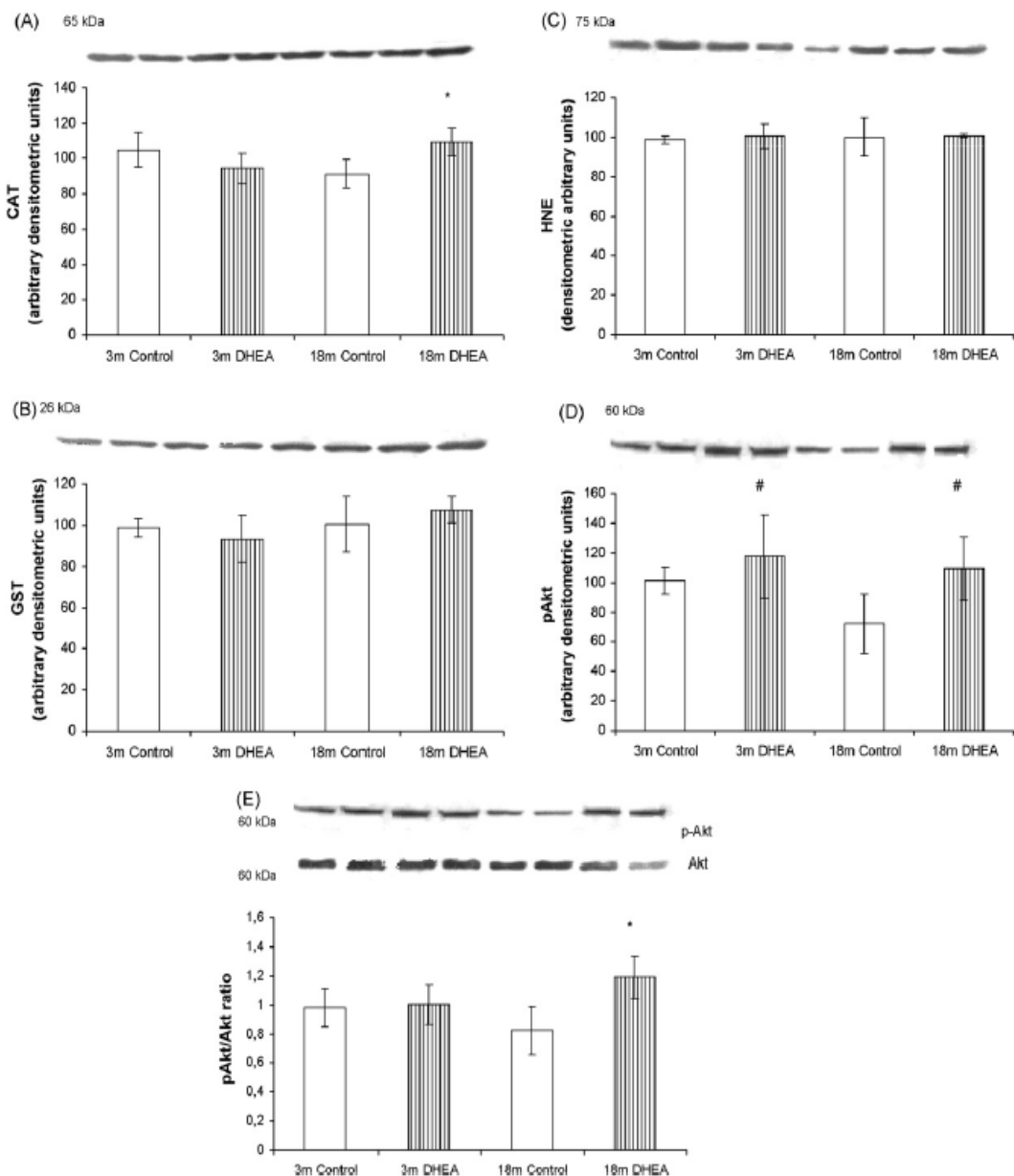
Marker of oxidative damage to membrane lipids (LPO by Chemiluminescence) and antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) in cardiac homogenates from different aging groups after DHEA treatment (10 mg/kg) or control.

Parameter/group	3 m control	3 m DHEA	18 m control	18 m DHEA
Chemiluminescence (cps/mg prot $\times 10^2$ )	66.26 $\pm$ 4.39	56.87 $\pm$ 6.39	76.15 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	73.32 $\pm$ 6.63 <sup>a</sup>
SOD (U/mg prot)	3.70 $\pm$ 0.79	3.21 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	4.16 $\pm$ 0.19	3.05 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>
CAT (pmol/mg prot)	57.72 $\pm$ 2.11	61.48 $\pm$ 4.13	60.97 $\pm$ 2.82	57.24 $\pm$ 5.16
GST (nmol/min/mg prot)	18.71 $\pm$ 3.39	17.34 $\pm$ 3.05	21.66 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	25.44 $\pm$ 3.07 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6 per group). Two-way ANOVA followed by SNK.

<sup>a</sup> Significantly different considering age, independently of treatment (p < 0.05).

<sup>b</sup> Significantly different considering treatment, independently of age (p < 0.05).



**Fig. 1.** Western blot analysis in cardiac homogenates after 5 weeks of 10 mg/kg DHEA treatment or control using CAT (A), GST (B), HNE (C), p-Akt (D) and the relation between p-Akt/Akt expression (E) antibodies, followed by representative western blots (two for each group). Data as mean  $\pm$  SD from 4 animals in each group. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by SNK. \*: Significantly different from its control, same age (p < 0.05); #: Significantly different considering treatment, independently of age (p < 0.05).



## 2.6. Data analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc Student–Newmann–Keuls (SNK) test was used for the statistical analysis of data, which are presented as the mean  $\pm$  SD. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

Table 1 shows LPO measured by chemiluminescence (CL) in rat heart homogenates. In 18-month-old groups, LPO presented a significant increase when compared to 3-month-old groups, independently of treatment.

Table 1 also presents the antioxidant enzyme activities of SOD, CAT and GST in heart homogenates in the different groups after chronic DHEA treatment. SOD activity was significantly reduced in heart homogenates after DHEA treatment in 3- and 18-month-old groups. There were no changes in CAT activity in heart homogenates of 3 or 18-month-old rats when compared to age or treatment factors. An increase of GST activity was observed in heart homogenates of 18-month-old groups when compared to 3-month-old rat groups, independently of treatment.

Protein expression values were expressed as arbitrary densitometric units. Fig. 1(A) presents CAT expression. After 5 weeks of DHEA (10 mg/kg) administration, CAT expression of 18-month-old group was significantly enhanced (about 10%) when compared to 18-month-old control group ( $p = 0.011$ ).

Both GST or HNE expressions (Fig. 1B and C, respectively) were not statistically different between treated and control groups in any age and between ages. Expression of p-Akt (Fig. 1D) was enhanced in treated groups when compared to controls, independently of age ( $p < 0.05$ ). Akt ratio (p-Akt/Akt) also showed an increase in 18-month-old treated group compared to 18-month-old control ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1E).

## 4. Discussion

The major outcome of this study was to demonstrate that p-Akt expression was enhanced in the groups treated with DHEA when compared to controls, independently of age. Regarding to the age factor, there was no difference between the groups studied in p-Akt expression. Akt ratio (p-Akt/Akt) was increased in treated 18-month-old group when compared to control group in the same age. It probably means that Akt protective potential was activated as an answer to DHEA chronic treatment, especially demonstrated in the 18-month-old group regarding to p-Akt/Akt ratio. The Akt (also known as protein kinase B) plays important roles in the signaling pathways in response to growth factors and other extracellular stimuli to regulate several cellular functions including nutrient metabolism, cell growth, survival and apoptosis [40]. Akt activity has been seen as a molecular interventional approach for treatment of cardiomyopathic damage resulting from debilitating changes of aging [41]. DHEA can act as a survival factor by triggering the galphai-PI3K/Akt-Bcl2 pathway against apoptosis. DHEA produced a vascular protective effect through a dose-dependent Akt phosphorylation [42]. Another study investigated the induction of apoptosis through the inhibition of Akt signaling pathway after incubation for 24 h with DHEA [43]. In a recent study from our group [36], DHEA acute treatment (50 mg/kg) to 3-month-old rats resulted in an elevation (47%) in myocardial protein levels of p-Akt/Akt ratio after 24 h. However, with 10 mg/kg DHEA acute treatment this effect was not repeated. Interestingly, in the present study, DHEA chronic treatment (10 mg/kg) has produced a p-Akt expression increased in both ages. Recent evidences have shown that serine/threonine kinases (including Akt) can be regulated by oxidants [20] offering new light to investigate the

relation between DHEA, myocardial aging and Akt. One of the mechanisms that would promote changes in some proteins phosphorylation is ROS concentration, by altering the intracellular redox state and by oxidative modification of proteins [44]. Hydrogen peroxide can directly alter protein conformation and promote higher susceptibility to phosphorylation [45]. Araujo and colleagues also suggested that hydrogen peroxide could directly alter Akt protein conformation promoting higher susceptibility to phosphorylation or, secondarily, promoting redox status imbalance [46].

In our study the 18-month-old treated group showed increased CAT expression when compared to 18-month-old control. An interesting study objected to examine the impact of cardiac-specific CAT overexpression on cardiac contractile function and protein damage in young and old male mice. It has shown that CAT protects cardiomyocytes from aging-induced cardiac dysfunction and protein damage. This study highlights the beneficial role of this enzyme in delaying the aging process and minimizing senescence-associated mortality [47].

There is increasing evidence that HNE is largely responsible for cytopathological effects observed during oxidative stress in vivo and it has been recognized as one of the most studied products of LPO [48]. More than that, HNE has been suggested to play critical roles in the pathogenesis of various diseases related to oxidative stress, such as atherosclerosis and diabetes [49]. We did not find any statistical difference between the studied groups considering HNE expression. Guedes and colleagues demonstrated that ROS are involved in neuropathic pain, which causes activation of Akt and also does not change HNE expression after 24 h [50].

DHEA can be a prooxidant agent *per se*. Goldfarb et al. [51] induced oxidative stress by DHEA or exercise (for 5 weeks) to determine whether vitamin E could protect male Sprague–Dawley rat hearts. DHEA increased CAT activity at rest and the results suggest that aerobic exercise and DHEA are mild oxidative stressors to the heart [51]. In our study, we measured LPO using CL, which is a sensitive assay to indicate oxidative damage. The 18-month-old groups showed an increase in CL when compared to 3-month-old groups. Both techniques utilized to assess LPO (CL and HNE expression) evaluate different stages of the LPO process. Despite the increase in LPO measured by CL, but not in HNE expression, it might be occurred a higher LPO production in such intermediate phase – between the ages studied – which could result in an enzymatic adaptation to compensate such answer.

It is known that GSTs constitute a family of enzymes that catalyze the conjugation of reactive chemicals with glutathione, and are involved in protecting cells generating GSH conjugates [52]. Once using a xenobiotic in this study, we have selected GST instead of glutathione peroxidase enzyme (GPx), which is also able to detoxify LPO products such as aldehydes (which play an important role in some of the pathophysiological effects related to oxidative stress) [53]. Our results suggest that the generation of LPO products was associated with the induction of GST activity, once both measurements were enhanced in the old group when compared to the young. The various compounds produced in the membrane LPO process – which can cause certain biological effects such as heart disease, aging and cancer [52] – are possibly related to the induction of GST activity. GST belongs to the peroxidase family that represents a second line of defense against hydrogen peroxide and organic peroxides [54]. Because this enzymatic activity increased, it is probable that peroxides – mainly the organic ones – have been accumulated in heart tissue of old animals, reinforcing the increased LPO measured by CL independently of DHEA effect at this specific age (18 m). Such a differential answer age-specific was demonstrated by other authors in various tissues, including heart [55]. Besides the increased enzyme activity, GST protein expression was not modified between groups probably due to many other factors cell inside that may influence the activity of this antioxidant



enzyme (e.g. substrate source, pH, temperature and redox status).

Our results have shown that SOD activity was significantly decreased after DHEA treatment compared to control groups, independently of age. In our study, the groups exposed to chronic DHEA treatment (3- and 18-month olds), probably might have inhibited SOD activity by some oxidation products [56]. Wu et al. [3] demonstrated DHEA effects in the thoracic aorta during the aging process of Wistar rats (18-month olds). After receiving 1 mg/kg DHEA in their food for 6 months, 18-month-old group has shown an increased SOD activity when compared to control. It is difficult to compare both studies, once the protocols used were distinct (kind and dosage) as well as the target tissue.

The treatment used in this study has increased DHEA serum concentration without changing testosterone levels. This protocol of treatment has produced an increase of about two to four times in DHEA serum concentration in 3-month-old (range  $\pm 2.5$  ng/ml before treatment) and 18-month-old (range  $\pm 1.5$  ng/ml before treatment) rats, reaching a range of approximately 7 ng/ml after drug administration. The levels of testosterone were not altered after this exogenous treatment (range  $\pm 0.2$ – $2.0$  ng/ml).

Our data has shown changes in oxidative stress parameters in parallel with Akt protein expression alterations. It does not mean necessarily a cause–consequence interaction, but since ROS are consistently evidenced as signaling molecules [44–46], such changes in oxidative stress could be related to this signaling pathway modulation. DHEA is likely to exert beneficial and/or toxic actions on cells not only through its potential as anti or prooxidant but rather through its modulation of signaling cascades. DHEA interactions with intracellular signaling could have important outcomes and must be related to aging, cell type, stimulus and disease focused.

Observations in human population trials, animal models and in vitro findings support the potential utility of DHEA as a possible therapeutic intervention. However, a better understanding of its mechanisms of action – either over oxidative stress and/or over cell signaling modulation – is crucial to elucidate DHEA potential benefic effects.

## Acknowledgement

This work was supported by CNPq, CAPES and FAPERGS (Brazilian Research Agencies).

## References

- Genazzani AD, Lanzoni C, Genazzani AR. Might DHEA be considered a beneficial replacement therapy in the elderly? *Drugs Aging* 2007;24(3):173–85.
- Bácsi K, Kósa J, Lazáry A, Horváth H, Balla B, Lakatos P, et al. Significance of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in different diseases. *Orvosi Hetilap* 2007;148(14):651–7.
- Wu S, Ruan Y, Yin M, Lai W. Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone. *Gerontology* 2007;53(4):234–7.
- Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D. The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995;774:259–70.
- Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C. The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis* 1996;125:1–13.
- Rabijewski M, Zgliczynski W. Positive effects of DHEA therapy on insulin resistance and lipids in men with angiographically verified coronary heart disease – preliminary study. *Endokrynologia Polska* 2005;56(6):904–10.
- Minamoto T, Komuro I. Vascular cell senescence; contribution to atherosclerosis. *Circulation Research* 2007;100(1):15–26.
- Picard J, Breton M, Deudon E. The role of arterial wall proteoglycan in arteriosclerosis. *La Semaine des Hôpitaux* 1979;55:748–52.
- Nakamura T, Fox-Robichaud A, Kikkawa R, Kashiwagi A, Kojima H, Fujimiyama M, et al. Transcription factors and age-related decline in apolipoprotein A-1 expression. *Journal of Lipid Research* 1999;40:1709–18.
- Orentreich N, Brind JL, Rizler LR, Vogelman JH. Age-changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1984;59:551–5.
- Migeon CJ, Keller AR, Lawrence B, Shepard TH. Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma: effect of age, sex, day-to-day and diurnal variation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1957;17:1051–62.
- Arlt W. Dehydroepiandrosterone and ageing. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004;18(3):363–80.
- Yildirim A, Gumus M, Dalga S, Sahin YN, Akcay F. Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant systems after renal ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 2003;33(4):459–64.
- Yoshimura M. Cardiac aldosterone. *Nippon Rinsho* 2006;64(5):837–42.
- Pelissier MA, Muller C, Hill M, Morfin R. Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* 2006;71(3):240–8.
- Aksouy Y, Yapanoglu T, Aksou H, Yildirim AK. The effect of dehydroepiandrosterone on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rabbits. *Urological Research* 2004;32(3):93–6.
- Gallo M, Aragno M, Gatto V, Tamagno E, Brignardello E, Manti R, et al. Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *European Journal of Endocrinology* 1999;141:35–9.
- Korantzopoulos P, Galaris D, Papaioannides D, Siogas K. The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention. *Medical Service Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2003;9(6):RA140–5.
- Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovascular & Hematological Disorders - Drug Targets* 2006;6(1):1–19.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telsler J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007;39:44–84.
- Dröge W. The plasma redox state and ageing. *Ageing Research Reviews* 2002;1(2):257–78.
- Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radical Biology & Medicine* 2005;38(9):1231–42.
- Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion. *Journal of Investigative Surgery* 2007;20(3):195–203.
- DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 2006;113(17):2097–104.
- Jacobshagen C, Gruber M, Teucher N, Schmidt AG, Unsold BW, Toischer K, et al. Celecoxib modulates hypertrophic signaling and prevents load-induced cardiac dysfunction. *European Journal of Heart Failure* 2008;10(4):334–42.
- Legrain S, Girard L. Pharmacology and therapeutic effects of dehydroepiandrosterone in older subjects. *Drugs Aging* 2003;20(13):949–67.
- Labrie F, Luu-The V, Martel C, Chernomoretz A, Calvo E, Morissette J, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG). *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2006;100:52–8.
- Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Teixeira VPA, et al. DHEA increases  $\beta$ -cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Letters* 2006;580:285–90.
- Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, et al. The phosphatidylinositol/Akt/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life Sciences* 2004;76(1):57–70.
- Liesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4-epididymicynin mice. *Tumori* 1985;71:241–9.
- Gonzalez-Flecha B, Liesuy SF, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radical Biology & Medicine* 1991;10:93–100.
- Marklund SL. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1985. p. 243–7.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984;105:121–6.
- Mannervick B, Gluthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). *Methods in Enzymology* 1981;77:231–5.
- Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- Jacob MHVM, Janner DR, Belló-Klein A, Liesuy SF, Ribeiro MFM. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2008;112(1–3):138–44.
- Laurine E, Lafitte D, Grégoire C, Séré E, Loret E, Douillard S, et al. Specific binding of DHEA to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(32):29979–86.
- Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265–75.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248–54.
- Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal Cellular Molecular Medicine* 2005;1:59–71.
- Sussman M. AKT<sup>ing</sup> lessons for stem cells: regulation of cardiac myocyte and progenitor cell proliferation. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2007;17(7):235–40.
- Liu D, Si H, Reynolds KA, Zhen W, Jia Z, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a galphai protein-

- dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. *Endocrinology* 2007;148(7):3068–76.
- [43] Jiang Y, Miyazaki T, Honda A, Hirayama T, Yoshida S, Tanaka N, et al. Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone. *Journal of Gastroenterology* 2005;40(5):490–7.
- [44] Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular Research* 2006;71(2):247–58.
- [45] Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SC. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Molecular Pharmacology* 2003;63:325–31.
- [46] Araujo A, Schenkel P, Enzweiler A, Fernandes T, Partata W, Llesuy S, et al. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Journal of Molecular Endocrinology* 2008;41(6):423–30.
- [47] Wu S, Li Q, Du M, Li S, Ren J. Cardiac-specific overexpression of catalase prolongs lifespan and attenuates ageing-induced cardiomyocyte contractile dysfunction and protein damage. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2007;34:81–7.
- [48] Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 2003;42(4):318–43.
- [49] Nakashima I, Liu W, Akhand AA, Takeda K, Kawamoto Y, Kato M, et al. 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *Molecular Aspects of Medicine* 2003;24(4–5):231–8.
- [50] Guedes RP, Araujo ASR, Janner D, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Partata WA. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2008;28(8):1049–56.
- [51] Goldfarb AH, McIntosh MK, Boyer BT. Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. *Journal of Applied Physiology* 1996;80(2):486–90.
- [52] Fukuda A, Nakamura Y, Ohgashi H, Osawa T, Uchida K. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione-S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;236:505–9.
- [53] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed Oxford: Clarendon Press; 1989.
- [54] Singal PK, Khaper N, Farahmand F, Belló-Klein A. Oxidative stress in congestive heart failure. *Current Cardiology Reports* 2000;2:206–11.
- [55] Candi F, Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radical Biology & Medicine* 1989;7(1):59–63.
- [56] Travacio M, Llesuy S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Ciência e Cultura* 1996;48:9–13.

### 5.3 Artigo 3

---

**Título:** Age-related effects of DHEA on peripheral markers of oxidative stress

---

**Status:** Artigo publicado (Cell Biochemistry & Function 2009, 27: 1-6)

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da administração crônica de DHEA sobre o estresse oxidativo nos eritrócitos de ratos de diferentes idades

**Conclusão:** DHEA produziu efeito prooxidante sobre todas as idades, especialmente na idade de 13 meses. Parece que aos 13 meses há uma importante depleção de alguns antioxidantes específicos, que pode ter evidenciado os efeitos da DHEA.

---



## Age-related effects of DHEA on peripheral markers of oxidative stress

Maria Helena Vianna Metello Jacob<sup>1,2\*</sup>, Daiane da R. Janner<sup>1</sup>, Matheus Parmegiani Jahn<sup>3</sup>, Luiz Carlos Kucharski<sup>3</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>2</sup> and Maria Flavia Marques Ribeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Interação Neuro-Humoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Ageing is an inevitable biological process characterized by a general decline in various physiological functions. DHEA and DHEAS levels are maximal between the second and third life decades, then start to decline 2% per year, leaving a residual of 10–20% of the peak production by the eighth decade. Erythrocytes are exposed to frequent oxidative stress due to the oxygen radicals continuously generated by haemoglobin auto-oxidation. We investigated DHEA chronic (10 mg/kg, subcutaneously, for 5 weeks) effects over oxidative stress markers in erythrocytes of male Wistar rats of 3, 13 and 18 month-old. In the 13 month-old group, we found increased lipid peroxidation (LPO), superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase and catalase activities when compared to the other age groups. DHEA produced a marked increase in LPO of 13 month-old group when compared to its control. DHEA exerted this pro-oxidant effects in all ages studied, especially in age 13 month-old. It seems that at 13 month-old there would be an important depletion of some specific anti-oxidant in order to determine such susceptibility to DHEA effects. Since this approach allows a minimally invasive assessment, it would be useful as a routine method in human clinical studies investigating DHEA effects during the ageing process. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS — DHEA; ageing; red blood cells; oxidative stress

### INTRODUCTION

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate ester (DHEAS) are the major circulating steroid hormones, which are produced abundantly by the mammalian adrenal cortex. DHEA and DHEAS levels are maximal between the second and third decades of life, then start to decline 2% per year, leaving a residual of 10–20% of the peak production by the eighth decade.<sup>1</sup> The age-decline in DHEA production is attracting attention because of its possible relevance to the aetiology and management of a number of age-related clinical disorders.<sup>2</sup> DHEA decrease associated with age may lead to auto-immune diseases, sexual dysfunction, osteoporosis, deterioration of lipid-metabolism, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases.<sup>3</sup>

Ageing is an inevitable biological process characterized by a general decline in various physiological functions.<sup>4</sup> One of the most accepted ageing theories is the free radical theory which proposes that physiological iron and other

metals would cause reactive oxygen species (ROS) formation, promoting oxidative damage over the life time.<sup>5</sup> These highly reactive species may initiate a great deal of deleterious peroxidative reactions in genetic cells apparatus, cell membranes, lipids and proteins. To protect cells, defence mechanisms utilize enzymatic and non-enzymatic anti-oxidants to avoid or to retard cellular damage arising from the oxidative stress—an imbalance between free radicals generation and anti-oxidant systems.<sup>6</sup>

Erythrocytes are particularly vulnerable to oxidative stress. Erythrocytes are exposed to frequent oxidative stress due to the ROS continuously generated by haemoglobin auto-oxidation. Besides that, high levels of unsaturated fatty acids are present in erythrocytes, and constitute particularly good substrates for peroxidation reactions.<sup>7</sup> Erythrocyte has proved to be an important and valuable model system for observing the effects of cell ageing, since it represents a peripheral marker.<sup>8</sup> There is a great diversity of studies *in vitro* and distinct models, but there is a lack considering *in vivo* studies. Measuring the changes in anti-oxidant enzyme activities in various tissues with increasing age has been an interesting approach in gerontological research.

Observations in human trials,<sup>9–11</sup> animal models<sup>12,13</sup> and *in vitro*<sup>14</sup> findings support the potential utility of DHEA as a

\* Correspondence to: M. H. V. M. Jacob, Laboratório de Interação Neuro-Humoral, ICBS - UFRGS, Av. Sarmento Leite 500 CEP 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel: 55.51.33083500. Fax: 55.51.33083453. E-mail: mhvmjacob@hotmail.com

therapeutic intervention. A significant clinical interest in DHEA is based on many observations, including a important decline production since early adulthood, literature evidences showing changes in this steroid levels associated with multiple pathologies and a pronounced replacement therapy with DHEA which may alleviate age-associated declines in a range of functions.<sup>14</sup> Since great controversial in this subject still remains and no sufficient data are available in literature to support its secure recommendation, it is indispensable to better understand DHEA's role in oxidative stress and peripheral blood. Therefore, the purpose of this work was to investigate DHEA chronic effects over oxidative stress markers in red blood cells of male Wistar rats of distinct ages.

## MATERIALS

### *Animals and treatments*

Thirty-six Wistar male rats (3, 13 and 18 months) obtained from the Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) were randomly assigned into control or DHEA (dehydroepiandrosterone; Calbiochem) (10 mg/kg) treated once a week, subcutaneously, for 5 weeks. Control groups received vehicle (vegetal oil). DHEA administration protocol was based on other studies.<sup>12,15,16</sup> Animals were housed in plastic cages (four animals in each) and received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21°C, 12 h light/dark cycle). After 5 weeks, animals were killed by decapitation. Special care was taken to minimize the number of animals used and their suffering. All animal procedures used in this study were in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (COBEA—Brazilian College of Animal Experimentation) and the experimental protocol was approved by UFRGS Animal Care Committee.

### *Preparation of the hemolysates*

Trunk blood samples were collected into tubes containing heparin as anticlotting agent. After centrifugation at 1000×g for 10 min, between 0–4°C (Sorval RC 5B-rotor SM24, Du Pont Instruments, EUA), plasma was removed. Erythrocytes were washed three times with saline solution (1:1 v/v) and the obtained packed cells were resuspended. The prepared hemolysates were used for the determination of enzymatic activities and lipoperoxidation levels determination.<sup>17</sup>

### *Determination of haemoglobin concentration*

Haemoglobin concentration was detected by the Drabkin reagent through the conversion of haemoglobin to cyanomethaemoglobin, measured against a standard curve.<sup>18</sup>

### *Lipid peroxidation*

Chemiluminescence (CL) was utilized to evaluate lipid peroxidation (LPO). CL was measured in a liquid scintillation

counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB—Produkter AB, Sweden). Erythrocytes were placed in low-potassium vials at a protein concentration of 0.5–1.0 mg of protein/ml in a reaction medium consisting of 120 mmol/L KCl, 30 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4). Measurements were started by the addition of 3 mmol/L tert-butyl hydroperoxide and the data expressed as counts per second per milligram of protein.<sup>19</sup>

### *Anti-oxidant enzyme activities*

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by measuring the velocity of oxidized pyrogallol formation. SOD activity, expressed as units per milligram of protein, is based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol.<sup>20</sup> The reaction medium contained Tris buffer (50 mmol/L, pH 8.2), pyrogallol (24 mmol/L) and catalase (CAT, 30 mmol/L). Absorbance changes were observed at 420 nm for 2 min.

Catalase activity was determined by following the decrease in 240 nm-absorption in a reaction medium containing 50 mmol/L phosphate buffer (pH = 7.2), and 10 mmol/L hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>21</sup> It was expressed as picomoles of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced per minute per milligram of protein.

Glutathione-S-transferase (GST) activity, expressed as picomoles per milligram of protein, was measured by the rate formation of dinitrophenol-S-glutathione at 340 nm. The reaction medium consisted of 19 mmol/L sodium phosphate buffer (pH = 6.5), 1 mmol/L GSH and 1 mmol/L chloride dinitrobenzene.<sup>22</sup>

### *Western blotting*

Erythrocytes were used for measuring anti-oxidant enzyme concentrations. Electrophoresis and protein transference were performed as described elsewhere.<sup>23,24</sup> The membranes were processed for immunodetection using rabbit polyclonal antibodies for CAT (65 kDa) and GST (26 kDa) (Chemicon). The bound primary antibodies were detected using goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate secondary antibody and membranes were revealed for CL. The autoradiographies generated were quantitatively analysed for the protein levels with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (Rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). The results from each membrane were normalized to the Ponceau values (5% in acetic acid) instead of using actin or tubulin as control, once DHEA could alter cytoskeleton proteins.<sup>25</sup> To minimize interassay variations, samples from all experimental groups were processed in parallel (*n* = 4 in each group).

### *Protein determination*

Protein was measured by the method of Lowry *et al.*,<sup>26</sup> using bovine serum albumin as standard. The results were expressed in mg of protein/ml. In Western blot analysis, protein was measured by the method of Bradford.<sup>27</sup>



## Data analysis

Two-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the *post hoc* Tukey's test was used for the statistical analysis of data, which are presented as the mean  $\pm$  SD. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. Correlations between two variables were made using Pearson's correlation test.

## RESULTS

Table 1 shows LPO measured by CL in rat erythrocytes. Considering both 13 month-old groups, this age group presented an increase in LPO when compared to 3 month-old and 18 month-old groups, independently of treatment. After 5 weeks of DHEA (10 mg/kg) administration, LPO showed significant increase in 13 month-old when compared to 13 month-old control group. The 13 month-old group treated with DHEA was also significantly increased when compared to 3 and 18 month-old treated groups.

Table 1 also presents the anti-oxidant enzyme activities of SOD, CAT and GST in erythrocytes in the different ageing groups after chronic DHEA treatment. SOD activity was significantly increased in both groups of 13 month-old erythrocytes when compared to 3 and 18 month-old groups, independently of treatment. SOD activity was positively correlated with CAT activity ( $r = 0.689$ ,  $p = 0.000018$ ). There was also an increase of CAT activity in erythrocytes of both 13 month-old rats when compared to 3 and 18 month-old groups, independently of treatment. An increase of GST activity was observed in erythrocytes of both 13 month-old groups when compared to both 3 month-old groups (independently of treatment).

Protein expression values were expressed as arbitrary densitometric units. Figure 1 presents CAT (A) and GST (B) immunocenters. After 5 weeks of DHEA (10 mg/kg) administration, neither CAT nor GST expression were statistically different considering both factors (treatment or age).

## DISCUSSION

Some steroids have been considered as anti-oxidants, including DHEA.<sup>28,29</sup> Effects of exogenous DHEA administration can be dual, anti-oxidant or pro-oxidant, depending on the dosage used and on the tissue specificity.<sup>30,31</sup> Gallo *et al.*,<sup>32</sup> in an *in vitro* experiment (Chang liver cells), pointed

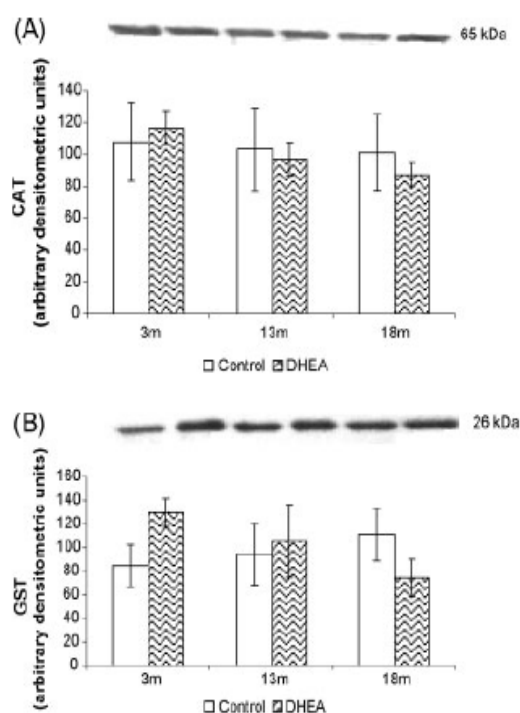


Figure 1. Western blot analysis in erythrocytes after 5 weeks of 10 mg/kg DHEA treatment or control using CAT (A) and GST (B) antibodies, followed by representative western blots (one for each group). Data as mean  $\pm$  SD from four animals in each group. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test

that slightly higher concentrations of DHEA (0.1  $\mu$ mol/L)—above those found in human tissues—protected cells against LPO induced by oxidative stress (cells received cumene hydroperoxide 0.5 mmol/L, a pro-oxidant stimulus). However, at pharmacological doses (10–50  $\mu$ mol/L), DHEA displayed a pro-oxidant activity. Also when administered in short-term (6 or 24 h) intraperitoneally, DHEA promoted a pro-oxidant answer in an *in vivo* model with healthy Wistar rat hearts with distinct doses (1, 10 and 50 mg/kg), demonstrating that time of administration can play an important role regarding DHEA and oxidative stress. Yet, after 24 h of 50 mg/kg DHEA single dose resulted in an elevation of protein levels of p-Akt/Akt ratio evaluated by Western Blot.<sup>24</sup> It is known that ROS concentration would

Table 1. Peripheral markers of oxidative damage to membrane lipids by Chemiluminescence (CL) and anti-oxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) in erythrocytes from the different groups after DHEA treatment (10 mg/kg) or control

Parameter/group	3 m Control	3 m DHEA	13 m Control	13 m DHEA	18 m Control	18 m DHEA
CL (cps/mg protein $\times 10^2$ )	50.98 $\pm$ 5.57	132.88 $\pm$ 21.84	144.21 $\pm$ 37.69 <sup>§  </sup>	616.18 $\pm$ 157.99 <sup>*,†,‡,§,  </sup>	49.84 $\pm$ 5.14	137.43 $\pm$ 18.71
SOD (U/mg protein)	5.17 $\pm$ 1.07	6.51 $\pm$ 2.01	8.85 $\pm$ 3.19 <sup>§,  </sup>	9.97 $\pm$ 1.17 <sup>§,  </sup>	6.15 $\pm$ 1.09	6.64 $\pm$ 2.65
CAT (pmol/mg protein)	72.35 $\pm$ 6.11	79.39 $\pm$ 22.21	146.43 $\pm$ 14.65 <sup>§,  </sup>	125.65 $\pm$ 17.55 <sup>§,  </sup>	76.71 $\pm$ 7.32	61.64 $\pm$ 16.61
GST (nmol/min/mg protein $\times 10^{-2}$ )	31.11 $\pm$ 8.88	36.04 $\pm$ 7.90	132.91 $\pm$ 22.39 <sup>§</sup>	63.16 $\pm$ 6.71 <sup>§</sup>	59.44 $\pm$ 14.76	49.92 $\pm$ 10.27

Values are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  per group). Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test.

\*Significantly different from its control, same age ( $p < 0.05$ ).

†Significantly different from 3 m, same treatment ( $p < 0.05$ ).

‡Significantly different from 18 m, same treatment ( $p < 0.05$ ).

§Significantly different from 3 m, independently of treatment ( $p < 0.05$ ).

||Significantly different from 18 m, independently of treatment ( $p < 0.05$ ).

promote changes in some proteins phosphorylation—such as tyrosine phosphatases, tyrosine kinases and mitogen-activated protein kinases,—by altering the intracellular redox state and by oxidative modification of proteins.<sup>33</sup> Araujo *et al.*,<sup>34</sup> have shown that hydrogen peroxide could directly alter protein conformation promoting higher susceptibility to phosphorylation or, secondarily, to promote redox status imbalance.

The profile of SOD activity in erythrocytes was the same during ageing regarding to LPO and GST activity, where a statistical significant increase was found in 13 month-old group comparing to other ages, independently of treatment. Probably the enhanced SOD activity in 13 month-old group would be demanded by an increased superoxide anion production, generating a high production of a less dangerous ROS: hydrogen peroxide. Thus, CAT enhanced activity in 13 month-old group comparing to 3 and 18 month-old groups, independently of treatment, must be reflected by the great substrate available (hydrogen peroxide), generating water. SOD activity was positively correlated with CAT activity ( $r = 0.689$ ,  $p = 0.000018$ ). This result corroborates the study of Sohal *et al.*,<sup>35</sup> which demonstrated that SOD and CAT activities were also positively correlated in the liver, heart and brain of different mammalian species, including ageing rats. The importance of this relationship is that it is suggestive of a coordinated capacity of anti-oxidant enzymes to clear up ROS generation, avoiding superoxide anion and hydrogen peroxide accumulation. During the ageing process the activity of anti-oxidant enzymes depends on multiple factors, such as race, gender, tissue and subcellular enzymes localization.<sup>36</sup>

It is widely accepted that LPO is an important and probably primary event in the progress of several diseases and degenerative process associated with ageing.<sup>37</sup> In our study, we measured LPO using CL, which is a sensitive assay to detect oxidative damage. The 13 month-old treated group showed a remarkable increase in CL when compared to its control (fourfold rise). The 13 month-old treated group also presented a remarkable elevation in CL when compared to 3 and 18 month-old treated groups, independently of treatment. Yet, LPO in 13 month-old group was modified when considering the factor age, significantly increased when compared to 3 or 18 month-old groups. LPO may be a result of a higher ROS production or decreased anti-oxidant defenses. However, this increased LPO in 13 month-old group could be a result of a great hydrogen peroxide production, indicated by the enhanced CAT activity. Öztürk and Gümüslü<sup>8</sup> have studied LPO contents assayed by TBARS technique in ageing erythrocytes (1, 6 and 12 month-old), and TBARS concentrations were increased with age. Rodríguez-Martínez *et al.*,<sup>38</sup> measured LPO through malondialdehyde (MDA) plasma levels of 6, 24 and 30 month-old Sprague-Dawley rats. There was an increase in MDA levels of 2 and 3 times in 24 and 30 month-old rats, respectively, when compared to the 6 month-old group. Our findings are in agreement with the results obtained from those studies when the first year (about 13 month-old) showed an enhanced oxidative stress profile, emphasized in the treated group. There are a wide range of conflicting results regarding to LPO during ageing. One explanation for

this statement may due to the differences in animal model, tissues examined and assay methods used.<sup>39</sup>

It is conceivable that both enhancement of free radicals generation and impairment of anti-oxidant defenses might be involved in the ageing development process.<sup>40</sup> Also previous works have described that anti-oxidant functions decline in almost all aged mammals studied.<sup>41</sup> In an effort to compare our findings with results reported in literature, age-related changes in the anti-oxidant enzymatic system could be contradictory, pointing to a rather complex relationship to link anti-oxidative enzymes with the ageing development. Regarding to our data, we could expect that the 18 month-old groups would be the most damaged one. However, this group demonstrated an oxidative stress scenario similar to the young ones. Surprisingly, literature has documented similar results, where oxidative balance could be improved in advanced aged animals when compared to other ageing phases, depending on the tissue and structure.<sup>13,39,42</sup> According to our data, possibly the oldest groups have normalized its defenses after an oxidative stress situation observed in the 13 month-old groups.

Once using a xenobiotic in this study, we have selected GST instead of glutathione peroxidase enzyme (GPx), which is also able to detoxify LPO products.<sup>43</sup> GST belongs to the peroxidase family that represents a second line of defense against hydrogen peroxide and organic peroxides.<sup>44</sup> GSTs constitute a family of multifunctional proteins which detoxifies a variety of electrophilic xenobiotics by catalysing their conjugation to glutathione and reduces many organic hydroperoxides into alcohols.<sup>45</sup> In our study, GST activity increased only in the 13 month-old group, independent of treatment. This suggests that the various compounds produced in the membrane LPO process—which can cause certain biological effects such as heart disease, ageing and cancer<sup>46</sup>—are possibly related to the increased GST activity. Interestingly, this same group (13 month-old) has shown the greatest LPO levels. The accumulation of organic peroxides—generated by DHEA and by the oxidative stress scenario established in this age—could have influenced GSH capacity of maintenance of enzymes in active forms—one of its important functions.<sup>47</sup> The mostly reported age-related loss in anti-oxidants is clearly the progressive decrease of intracellular GSH in aged tissues.<sup>47</sup> Groups 3 and 18 month-old did not present any change in GST activity. Such a differential age-specific answer would be related to the distinct oxidative stress scenario in each age stage.

Regarding to CAT and GST expressions, there were no changes considering both variables studied. The protein expression of the anti-oxidant enzymes was not modified between such groups (age or treatment) probably because the ROS generated would not be sufficient to modify protein synthesis; however, these were efficient to change some anti-oxidant activities. Probably there are other intracellular factors influencing the concentration of these anti-oxidant enzymes, such as substrate source and temperature, which we have not considered as a goal.

From the data here presented, it is clear that there were DHEA pro-oxidant effects, evidenced by LPO in all ages



studied. Especially in age 13 month-old, DHEA promoted a marked increase in LPO. The increased LPO in age 13 month-old—independently of treatment—might be a consequence of enhanced ROS, which, in turn, would be a stimulus or a source to the higher SOD, CAT and GST activities in this group. Öztürk and Gümüslü<sup>8</sup> observed a significant decrease in the redox index during ageing, which may be related to decreased total glutathione levels and increased GSSG measured in the reported study. In agreement with our hypothesis, erythrocyte GSH concentrations were significantly decreased in 12 month-old rats when compared to 1 or 6 month-old groups.<sup>8</sup> Consistent with this result, Liu and Choi<sup>48</sup> reported that rat erythrocyte GSH concentrations were lower in 12 month-old rats when compared to 3 month-old rats. From our data it seems that about 13 month-old rats could be at the age at which ROS-dependent damage is accumulated, and the increased antioxidant enzyme activities were not sufficient to prevent the enhanced LPO at this specific age.

Whether or not the modified oxidative stress scenario found in this chronic DHEA administration is linked to adverse health effects related to its chronic and free use worldwide considering ageing remains unclear. These results reinforce how necessary is to investigate DHEA effects over red blood cells and ROS *in vivo* to elucidate this steroid effects in such an important and accessible tissue, considering its feasibility as routine method in human clinical studies.

In the present investigation, the first study of erythrocytes and DHEA to be conducted on ageing rats treated with DHEA regarding to peripheral markers of oxidative stress, we examined some anti-oxidant enzyme activities and expressions and LPO in erythrocytes, therefore they are representative cells considering the whole body system and its circumstances. Indeed, oxygen radicals and hydrogen peroxide are permanently produced by haemoglobin autoxidation,<sup>49</sup> exposing erythrocytes to oxidative stress continuously. The field of blood redox biology is rapidly advancing and encompasses several important areas as ageing probably because it represents a minimal invasive procedure which can propose a current knowledge about measuring oxidative stress in human and animal biological samples.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq, CAPES and FAPERGS (Brazilian Research Agencies).

#### REFERENCES

- Genazzani AD, Lanzoni C, Genazzani AR. Might DHEA be considered a beneficial replacement therapy in the elderly? *Drugs Aging* 2007; **24** (3): 173–185.
- Ledochowski M, Murr C, Jäger M, Fuchs D. Dehydroepiandrosterone, ageing and immune activation. *Exp Gerontol* 2001; **36**: 1739–1747.
- Bácsi K, Kósa J, Lazáry A, et al. Significance of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in different diseases. *Orvosi Hetilap* 2007; **148** (14): 651–657.
- Arivazhagan P, Shila S, Kumaran S, Pameerselvam C. Effects of DL- $\alpha$ -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Exp Gerontol* 2002; **37**: 803–811.
- Harman D. Aging: a theory based on free radicals and radiation biology. *J Gerontol* 1956; **11**: 298–300.
- Dröge W. The plasma redox state and ageing. *Ageing Res Rev* 2002; **1** (2): 257–278.
- Katherine AS, Thomas P, LaBerge W, Thomas J. *In vivo* oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free Radic Biol Med* 1997; **22**: 835–842.
- Öztürk O, Gümüslü S. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, cooper, zinc-superoxide dismutase and catalase activities, glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. *Exp Gerontol* 2004; **39**: 211–216.
- Nakamura S, Yoshimura M, Nakayama M, et al. Possible association of heart failure status with synthetic balance between aldosterone and dehydroepiandrosterone in human heart. *Circulation* 2004; **110**(13): 1787–1793.
- Mühlen D, Laughlin GA, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. The Dehydroepiandrosterone and wellness (DAWN) study: research design and methods. *Contemp Clin Trials* 2007; **28**: 153–168.
- Yamada Y, Sekihara H, Omura M, et al. Changes in serum sex hormone profiles after short-term low-dose administration of DHEA to young and elderly persons. *Endocr J* 2007; **54**: 153–162.
- Campbell CS, Caputo LC, Hirata AE, et al. The phosphatidylinositol/Akt/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats *in vivo*. *Life Sci* 2004; **76** (1): 57–70.
- Wu S, Ruan Y, Yin M, Lai W. Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone. *Gerontology* 2007; 234–237.
- Mo Q, Lu S, Simon NG. Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential effects on adrogen receptor trafficking and transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; **99**: 50–58.
- Medina MC, Souza LC, Caputo LC, et al. DHEA increases  $\beta$ -cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Lett* 2006; **580**: 285–290.
- Jacob MHVM, Janner DR, Jahn MP, Kucharski LCR, Belló-Klein A, Ribeiro MFM. DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in aged rats. (DOI 10.1016/j.steroids.2009.08.005)
- Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; **255**: 107–117.
- Drabkin DL, Austin J. Spectrophotometric studies: preparation from washed blood cells, nitric oxide haemoglobin and sulfahaemoglobin. *J Biol Chem* 1935; **112**: 51–57.
- Gonzalez-Flecha B, Llesuy SF, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991; **10**: 93–100.
- Marklund SL. Pyrogallol autoxidation. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Greenwald RA (ed.). CRC Press: Boca Raton, Florida, 1985; 243–247.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol* 1984; **105**: 121–126.
- Mannervick B, Gluthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). *Method Enzymol* 1981; **77**: 231–235.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685.
- Jacob MHVM, Janner DR, Belló-Klein A, Llesuy SF, Ribeiro MFM. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; **112** (1–3): 138–144.
- Laurine E, Lafitte D, Grégoire C, et al. Specific binding of DHEA to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. *J Biol Chem* 2003; **278** (32): 29979–29986.
- Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265–275.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–254.

28. Yildirim A, Gumus M, Dalga S, Sahin YN, Akcay F. Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant systems after renal ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Ann Clin Lab Sci* 2003; **33** (4): 459–464.
29. Yoshimura M. Cardiac Aldosterone. *Nippon Rinsho* 2006; **64** (5): 837–842.
30. Pelissier MA, Muller C, Hill M, Morfin R. Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* 2006; **71** (3): 240–248.
31. Aksoy Y, Yapanoglu T, Aksou H, Yildirim AK. The effect of dehydroepiandrosterone on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rabbits. *Urol Res* 2004; **32** (3): 93–96.
32. Gallo M, Aragno M, Gatto V, *et al.* Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *Eur J Endocrinol* 1999; **141**: 35–39.
33. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; **71** (2): 247–258.
34. Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler A, *et al.* The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 2008; **41** (6): 423–430.
35. Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech Ageing Dev* 1990; **53** (3): 217–227.
36. Augustyniak A, Skrzydlewska E. Antioxidative abilities during aging. *Postepy Hig Dosw* 2004; **58**: 194–201.
37. Sivonova M, Tatarikova Z, Durackova Z, *et al.* Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and DNA in aged rats. *Physiol Res* 2007; **56**: 757–764.
38. Rodríguez-Martínez MA, Alonso MJ, Redondo J, Salaices M, Marín J. Role of lipid peroxidation and the glutathione-dependent antioxidant system in the impairment of endothelium-dependent relaxations with age. *Br J Pharmacol* 1998; **123**: 113–121.
39. Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med* 1998; **24** (9): 1477–1484.
40. Siqueira IR, Fochesatto C, Torres ILS, Dalmaz C, Netto CA. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sci* 2005; **78**: 271–278.
41. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992; **275**: 257–266.
42. Coling D, Chen S, Chi LH, Jamesdaniel S, Henderson D. Age-related changes in antioxidant enzymes related to hydrogen peroxide metabolism in rat inner ear. *Neurosci Lett* 2009; **464**(1): 22–25.
43. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd edn). Clarendon Press: Oxford, 1989.
44. Singal PK, Khaper N, Farahmand F, Belló-Klein A. Oxidative stress in congestive heart failure. *Curr Cardiol Rep* 2000; **2**: 206–211.
45. Jakoby WB. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1978; **46**: 383–414.
46. Fukuda A, Nakamura Y, Ohigashi H, Osawa T, Uchida K. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **236**: 505–509.
47. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; **333**: 19–39.
48. Liu R, Choi J. Age-associated decline in  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene expression in rats. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**: 566–574.
49. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972; **247**: 6960–6962.

## 5.4 Artigo 4

---

**Título:** Redox imbalance influence in the myocardial Akt activation in aged rats treated with DHEA

---

**Status:** Artigo submetido (Rejuvenation Research)

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da administração crônica de DHEA sobre o estresse oxidativo no coração de ratos adultos jovens e velhos, e verificar se tais mudanças estariam associadas às alterações no estado redox. Ainda, correlacionar a concentração de peróxido de hidrogênio à possível modulação da expressão de proteínas redox-sensíveis.

**Conclusão:** A DHEA aumentou significativamente a atividade da GST no miocárdio dos grupos 3 e 24 meses. O fator idade diminuiu a concentração de peróxido de hidrogênio e a concentração proteica de Nrf2, independentemente do tratamento. Entretanto, a idade aumentou as concentrações de GST, Akt e p-Akt em ambos os grupos de 24 meses. O grupo 24 meses tratado com DHEA respondeu diferentemente considerando as medidas de GSSG, a atividade da GPx e a concentração da p-Akt. Mais estudos são necessários para concluir sobre a eficácia e a segurança do uso de DHEA na reposição hormonal no envelhecimento, o que pode contribuir para um melhor entendimento dos efeitos da DHEA sobre os parâmetros de estresse oxidativo e a modulação de vias de sinalização.

---



# Rejuvenation Research

Rejuvenation Research: <http://mc.manuscriptcentral.com/rejuvenationresearch>

## Redox imbalance influence in the myocardial Akt activation in aged rats treated with DHEA

Journal:	<i>Rejuvenation Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Articles
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Jacob, Maria Helena Janner, Daiane Araujo, Alex Sander Jahn, Matheus Kucharski, Luiz Carlos Moraes, Tarsila Dutra Filho, Carlos Ribeiro, Maria Flavia Belló-Klein, Adriane
Keyword:	Aging, Antioxidants, Cardiovascular Aging



Redox imbalance influence in the myocardial Akt activation in aged rats treated with DHEA

Maria Helena Vianna Metello Jacob (\*) ([mhvmjacob@hotmail.com](mailto:mhvmjacob@hotmail.com))

(Laboratório de Interação Neuro-Humoral, ICBS - UFRGS, Brasil)

Daiane da Rocha Janner ([daia\\_janner@yahoo.com.br](mailto:daia_janner@yahoo.com.br))

(Laboratório de Interação Neuro-Humoral, ICBS - UFRGS, Brasil)

Alex Sander da Rosa Araújo ([alsanderaraujo@hotmail.com](mailto:alsanderaraujo@hotmail.com))

(Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, ICBS – UFRGS, Brasil)

Matheus Parmegiani Jahn ([matheusjahn@hotmail.com](mailto:matheusjahn@hotmail.com))

(Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, ICBS – UFRGS, Brasil)

Luiz Carlos Rios Kucharski ([kuchars@ufrgs.br](mailto:kuchars@ufrgs.br))

(Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, ICBS – UFRGS, Brasil)

Tarsila Barros Moraes ([tarsilabio@yahoo.com.br](mailto:tarsilabio@yahoo.com.br))

(Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, ICBS – UFRGS, Brasil)

Carlos Severo Dutra Filho ([dutra@ufrgs.br](mailto:dutra@ufrgs.br))

(Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, ICBS – UFRGS, Brasil)

Maria Flavia Marques Ribeiro ([mflavia@ufrgs.br](mailto:mflavia@ufrgs.br))

(Laboratório de Interação Neuro-Humoral, ICBS – UFRGS, Brasil)

Adriane Belló-Klein ([belklein@ufrgs.br](mailto:belklein@ufrgs.br))

(Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, ICBS – UFRGS, Brasil)

**Word count: 3878**

**Address for correspondence and reprints:**

Maria Helena Vianna Metello Jacob (\*) ([mhvmjacob@hotmail.com](mailto:mhvmjacob@hotmail.com))

(Laboratório de Interação Neuro-Humoral, ICBS - UFRGS, Av. Sarmiento Leite 500 CEP 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil)(telephone 55.51.33083500) (Fax 55.51.33083453)

**Key words:** DHEA, aging, heart, GSH, hydrogen peroxide, Akt

**Abbreviated title:** Redox imbalance influence in Akt activation

## ABSTRACT

This study examined, in young and old (3 and 24 month-old, respectively) healthy Wistar rats, the in vivo effect of DHEA (10 mg/kg body weight) administered subcutaneously for 5 weeks. Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione levels, glucose – 6- phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione- S – transferase (GST) and thioredoxin (Trx) reductase activities, hydrogen peroxide steady-state concentration and Nrf2, GST, Trx-1, Akt and p-Akt expressions were assessed in heart tissue. DHEA treatment significantly increased GST activity in 3 and 24 month-old treated groups. The aging factor diminished hydrogen peroxide concentration and Nrf2 expression, independently of treatment. However, the aging process increased GST, Akt and p-Akt expressions in both 24 month-old groups. Aged group have responded in a different manner to DHEA effects regarding to GSSG content, GPx activity and p-Akt concentration. Further studies are needed to form conclusions about the efficacy and the safety of DHEA replacement in the elderly, and it militates to a better understand of DHEA net effect over oxidative stress parameters and its modulation of signaling cascades.

## INTRODUCTION

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate ester (DHEAS) are steroid hormones produced by the adrenal cortex. One of the main characteristics of DHEA is its age-dependent pattern of secretion. Its production begins during fetal life, reaches the highest serum levels between 20 and 30 years, then there is a steady decrease around 2 to 5% per year, leaving a residual of 10-20% serum concentration of that observed in young adults (1). The age-related decline in DHEA production is attracting attention because of its possible relevance to the etiology and management of many age-related clinical disorders (2).

Epidemiological studies have shown that atherosclerotic disease and cardiovascular mortality are inversely associated with DHEA and DHEAS concentrations, mainly in males (3, 4). The incidence and prevalence of atherothrombotic diseases, as stroke and coronary heart disease, increase with aging (5). Important studies have shown association between aging and biochemical modifications in the arterial wall and in lipoproteins (6) and in the hormonal status including DHEA (7), which might be related to the increased incidence of coronary heart disease. Since DHEA secretion exhibits an age-associated pattern, which is characterized by declining with aging, this steroid has generated major interest as an "anti-aging" hormone (8).

Aging is a progressive deterioration in physiological functions and metabolic processes. It has been widely postulated that accumulation of oxidative damage to cellular components is a causal factor in the aging process (9). Reactive oxygen species (ROS) including superoxide anion, hydrogen peroxide, and the highly reactive hydroxyl radical can be toxic at high levels but



can also regulate genes that control cell growth and differentiation (10). To protect cells, defense mechanisms utilize enzymatic and non-enzymatic antioxidants to avoid or to retard cellular damage arising from the oxidative stress - an imbalance between free radicals generation and antioxidant systems. Cells are able to generate ROS endogenously which induce and maintain signal transduction pathways (11).

Reduced glutathione (GSH) is the main nonprotein thiol involved in the antioxidant cellular defense, and is produced in all cell types. It acts in the detoxification of xenobiotics and naturally deleterious compounds, such as hydrogen peroxide, other peroxides and free radicals. GSH also acts as a cosubstrate for GPx in quenching hydrogen peroxide and organic peroxides (12). GSH depletion is linked to a number of disease states such as cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases in humans (13). Among other antioxidants, mammalian heart is also protected by the redox-regulated protein thioredoxin (Trx). Thioredoxin is not only involved in cytoprotective functions against oxidative stress, but also in the regulation of cellular proliferation and the aging process. ROS are able to promote Trx translocation to the nucleus, where it can modulate redox-sensitive proteins transcription (14). Another pivotal role in redox-sensitive proteins transcription is accomplished by the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) (15).

Several lines of evidence suggest that Nrf2 plays a critical role in the regulation of the cellular GSH homeostasis (16). Nrf2, which binds to the antioxidant response element (ARE), has been demonstrated to be a critical transcription factor in the promoter region of a number of genes, encoding for antioxidative and phase 2 enzymes in several types of cells and tissues. The



upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes – involved in detoxification of electrophilic xenobiotics – in cardiac tissue/cells constitute a strategy to protect against oxidative cardiac injury (17).

Many hypotheses have been postulated for cardiac aging, including altered membrane structure and permeability, prolonged action potential duration and accumulation of ROS (18). ROS have also an important physiological role in the intracellular regulation and signaling (19), by transmitting downstream signals via induced alterations in protein redox status (20). It has been shown that moderate levels of hydrogen peroxide may activate the Akt and eNOS pathways, suggesting that oxidative stress can cause changes in proteins, influencing the regulation of signal transduction (21). Akt is a serine/threonine kinase, which inhibits apoptotic cycle and stimulates growth pathways. Akt acts as a survival kinase by phosphorylating a number of apoptosis-regulatory molecules (22). Such pathway seems to be involved in the regulation of cardiac growth and increased cardiac function (23).

Some steroids have been considered as antioxidants, including DHEA (24, 25). Effects of exogenous DHEA administration can be dual, antioxidant or prooxidant, depending on the dosage used and on the tissue specificity (26, 27). More than that, Nakamura and others have shown that there is cardiac DHEA production in control human heart, whereas its production decreases in the failing heart. DHEA amount synthesized by heart may be too small to have any endocrine function, and it may act as an autocrine /paracrine factor within the healthy heart (28).

Experimental *in vivo* and *in vitro* studies indicate that DHEA inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity in mammalian cells by

binding to the enzyme-coenzyme substrate ternary complex, and it may, as a result, promote oxidative stress. DHEA is a potent uncompetitive inhibitor of G6PDH which converts glucose-6-phosphate into 6-phosphogluconate in an NADP<sup>+</sup> - dependent process, generating NADPH (29).

The main goal of the present study was to compare chronic DHEA administration effects over young and aging rat hearts, and verify whether these changes would be associated to redox imbalance variations. Additionally, we intend to correlate the hydrogen peroxide concentration – evidenced as a signaling molecule – to a possible modulation of redox-sensitive protein expressions such as Trx-1, Akt and Nrf2.

#### MATERIALS AND METHODS

**Animals and Treatments:** Twenty-four Wistar male rats (3 and 24 months) obtained from the Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) were randomly assigned into control or DHEA (dehydroepiandrosterone; Calbiochem) (10mg/kg) treated once a week, subcutaneously, for 5 weeks. Control groups received vehicle (vegetal oil). DHEA administration protocol was based on other studies (30, 31, 32). Animals were housed in plastic cages (four animals in each) and received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12 h light/dark cycle). After 5 weeks, animals were killed by decapitation and their hearts were quickly removed. We have used transversal slices of the entire heart for all assays (left + right chambers). Heart samples (approximately 100 mg) were frozen on dry ice and stored at -80°C for western blotting. Remaining heart tissue was used to measure hydrogen peroxide, glutathione concentration, and antioxidant

enzymes. Special care was taken to minimize the number of animals used and their suffering. All animal procedures used in this study were in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (COBEA –Brazilian College of Animal Experimentation) and the experimental protocol was approved by UFRGS Animal Care Committee.

***Determination of oxidized and reduced glutathione concentration:*** To determine oxidized and reduced glutathione concentration, tissue was deproteinized with 2 mol/L perchloric acid, centrifuged for 10 min at 1000 X g and the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide. The reaction medium contained 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.2), 2 mmol/L nicotinamide dinucleotide phosphate acid, 0.2 U/mL glutathione reductase, 70  $\mu$ mol/L 5,5' dithiobis (2-nitrobenzoic acid). To determine reduced glutathione, the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide, to react with 70  $\mu$ mol/L 5,5' dithiobis (2-nitro benzoic acid), and the absorbance values measured at 420 nm (33).

***Hydrogen peroxide steady-state concentration:*** Hydrogen peroxide was measured via its horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red. Slices of fresh tissue from ventricles were incubated for 30 min. at 37°C in phosphate buffer 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L and dextrose 5 mmol/L). The supernatants were transferred to tubes with phenol red 0.28 mmol/L and 8.5 U/mL HRPO. After 5 min incubation, 1 mol/L NaOH was added and the solution's absorbance values measured at 610 nm. The results were expressed in nmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ g tissue (34).

***Antioxidant enzyme activities:***

**Glutathione-S-transferase (GST)** activity, expressed as picomoles per milligram of protein, was measured by the rate formation of dinitrophenol-S-glutathione at 340 nm. The reaction medium consisted of 19 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 6.5), 1 mmol/L GSH, and 1 mmol/L chloride dinitrobenzene (35).

**Glutathione peroxidase (GPx)** catalyzes reduced glutathione oxidation in the presence of peroxides. Its activity was expressed as nanomole of NADPH reduced per minute per milligram of protein. Selenium-dependent and -independent GPx activities were measured by following NADPH oxidation at 340 nm in a reaction medium containing 0.17 mmol/L reduced glutathione, 0.2 U/mL glutathione reductase, and 0.5 mmol/L tert-butyl hydroperoxide (which reacts with both the Se-dependent and non-Se-dependent GPx), as described by Flohé and Gunzler (36).

**Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)** assay was measured by the method of Leong and Clark (37), in which the reaction mixture (1 mL) contained: 100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L NADP<sup>+</sup>, and sample. The reaction was started by the addition of 1 mmol/L glucose-6-phosphate and was followed in a spectrophotometer at 340 nm. One G6PDH unit corresponds to 1 mmol of substrate transformed per minute and the specific activity is represented as units per mg protein.

**Thioredoxin reductase (Trx reductase)** activity was determined using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and NADPH. The method is based on the reduction of DTNB, which is indicated by an increase in absorbance at 412 nm. The amount of DTNB reduced was calculated using the absorption coefficient of  $13.6 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (38).



**Western blotting:** Heart samples were homogenized (Ultra-Turrax) with lysis buffer, pH 7.4, proportionally to weight (20 mL/g of tissue). Electrophoresis and protein transference were performed as described elsewhere (39, 40). The membranes were processed for immunodetection using rabbit polyclonal antibodies for GST (26 kDa) (Chemicon), p-Akt (ser 473) (60 kDa), Akt (60 kDa), Trx-1 (55 kDa) and Nrf2 (68 kDa) (Santa Cruz Biotechnology). The bound primary antibodies were detected using goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate secondary antibody and membranes were revealed for chemiluminescence. The autoradiographies generated were quantitatively analyzed for the protein levels with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (Rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). The results from each membrane were normalized to the Ponceau values (5% in acetic acid) instead of using actin or tubulin as control, once DHEA could alter cytoskeleton proteins (41). To minimize interassay variations, samples from all experimental groups were processed in parallel (n=4 in each group). Protein expression values were expressed as arbitrary densitometric units.

**Protein determination:** Protein was measured by the method of Lowry et al. (42), using BSA as standard. The results were expressed in mg of protein/mL. In Western blot analysis, protein was measured by the method of Bradford (43)

**Data analysis:** Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc Student-Newmann-Keuls (SNK) test was used for the statistical analysis of data, which are presented as the mean  $\pm$  SD. Values of  $p < 0.05$  were

considered significant. Correlations between two variables were made using Pearson's correlation test.

## RESULTS

The related changes in GSH total levels, GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio evaluated in cardiac samples in the different groups are reported in Table 1. There were no changes in GSH total levels nor in reduced GSH levels in heart homogenates of 3 or 24 month-old groups considering age or treatment factors. A decrease of GSSG levels was observed in cardiac samples of 3 month-old treated group when compared to its control. Considering GSSG levels in 24 month-old treated group there was an increase when compared to its control as well as when compared to 3 month-old treated group. Also GSSG levels in 24 month-old groups were increased when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. An increase of GSH/GSSG ratio was observed in heart homogenates of 3 month-old treated group when compared to its control, and a decrease of this index was found in 24 month-old treated group when compared to 3 month-old treated group. Also GSH/GSSG ratio in 24 month-old groups was decreased when compared to 3 month-old groups, independently of treatment.

Table 2 shows the antioxidant enzymes activities of G6PDH, GPx, GST and Trx reductase in heart homogenates in the different groups. A decrease of G6PDH activity was observed in heart homogenates of 3 month-old treated group when compared to its control. No changes were found between the two 24 month-old groups regarding to G6PDH activity. GPx activity was significantly increased in 3 month-old treated group when compared to its control, however a

decreased activity was found in 24 month-old treated group when compared to its control. The 24 month-old treated group had significantly diminished GPx activity when compared to 3 month-old treated group. Also GPx activity in 24 month-old groups was decreased when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. GST activity was significantly increased in heart homogenates after DHEA treatment in 3 and 24 month-old groups when compared to controls. There were no changes in Trx reductase activity in heart homogenates of 3 or 24 month-old groups considering age or treatment factors.

Expression of GST (Figure 1A) was enhanced in 24 month-old groups when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. An enhancement of GST expression was found in 24 month-old control when compared to 3 month-old control group. Trx-1 expression (Figure 1B) did not present any significant change in heart homogenates of 3 or 24 month-old groups when compared to age or treatment factors.

Figure 2 presents myocardial hydrogen peroxide concentration (A) and western blot analysis of Nrf2 antibody (B). A decrease of hydrogen peroxide concentration was observed in cardiac samples of 24 month-old groups when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. The 24 month-old treated group had significantly diminished hydrogen peroxide concentration when compared to 3 month-old treated group, and this same result was observed comparing control groups. Nrf2 expression showed exactly the same result profile of hydrogen peroxide concentration. Hydrogen peroxide concentration was positively correlated with Nrf2 protein expression ( $r=0.62$ ,  $p=0.0064$ ).

Figure 3A presents the increase of total Akt expression in 24 month-old groups when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. The 24 month-old treated group had significantly increased total Akt expression when compared to 3 month-old treated group, and this same result was observed comparing control groups.

Expression of p-Akt (Figure 3B) was enhanced in 24 month-old groups when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. An increase of p-Akt expression was found in 24 month-old treated group when compared to 24 month-old control group. A positive correlation was found between p-Akt expression and the GSSG levels ( $r= 0.7547$ ,  $p=0.0012$ ).

## DISCUSSION

The major outcome of this study was to demonstrate that DHEA displayed different effects over young and old rat hearts. Regarding to our data, the significantly increased GSSG levels and the decreased GSH/GSSG ratio in the 24 month-old groups when compared to the young ones, independently of treatment, corroborate the statement that increased free radicals generation and impairment of antioxidant defenses might be strongly related to the aging development. In order to counteract, antioxidant defense systems had to adapt itself, and these changes could be expressed by GPx activity, GST and Akt protein concentration - which is a survival and adaptative signaling protein.

Oxidative stress provokes perturbations in cellular GSH levels by affecting the biosynthesis or altering the ratio of intracellular reduced and oxidized forms of glutathione that affect multiple physiological responses (16). In this study, the amount of GSSG was increased in the aged groups when



compared to the young ones, and this fact was expected by the aging process itself. Sivonová and co-workers (44) have shown an age-related decline in myocardial antioxidant capacity accompanied by a significant loss in total sulfhydryl content and increased lipid peroxidation in old male Wistar rats (15 and 26 month-old). DHEA has increased the GSSG levels in 24 month-old group when compared to 24 month-old control and when compared to 3 month-old treated group. These results have shown that aged animals have responded differently to DHEA treatment. However, when comparing both 3 month-old groups, the steroid has significantly diminished GSSG levels, taking another profile over young rat hearts. The GSH/GSSG ratio was significantly decreased in 24 month-old groups when compared to both 3 month-old groups, independently of treatment, due to increased GSSG levels in the aged rats. These results are related to GSSG levels and to its accumulation over time-life in aging development. DHEA treatment to aged rats induced diminished GSH/GSSG ratio while it increases this ratio in the young ones.

G6PDH catalyses the first step of the pentose-phosphate pathway supplying cells with ribose-5-phosphate – a precursor of nucleic acid synthesis – and NADPH for biosynthetic process and protection against oxidative stress (45). G6PDH is an important source of NADPH, which is required as a cofactor for the conversion of GSSG to GSH by glutathione reductase to restore the intracellular thiol redox status. Studies with DHEA suggest the importance of G6PDH inhibition in reducing inflammation, hyperplasia and carcinogenesis, taking evidence to indicate that G6PDH inhibition may retard the rate of development of age-related diseases (46). In our study, the young treated group did present a significantly diminished G6PDH activity when compared to the

young control group. This response could be related to a minor necessity of GSH regeneration in the young group, once GSSG was less generated, resulting in diminished substrate availability to G6PDH activity. It has also been reported that DHEA inhibits G6PDH activity, an important factor to consider the different G6PDH profile between both young groups (46).

DHEA administered to young rats resulted in increased GPx activity when compared to young control group. Probably DHEA has generated increased concentration of peroxides, which is a specific substrate to GPx activity. However, this same group has presented less GSSG formation and greater GSH/GSSG ratio when compared to young control group. Considering the old groups, DHEA has decreased GPx activity. DHEA has decreased GPx activity in 24 month-old group when compared to 3 month-old treated group. Again this result has shown that aged animals have shown a different answer to DHEA treatment. GPx activity was significantly decreased in 24 month-old groups when compared to both 3 month-old groups, independently of treatment. The increased GSSG formation and the diminished GSH/GSSG ratio in aged animals would constitute unfavorable conditions to an ideal GPx activity.

It is known that GSTs constitute a family of enzymes that catalyzes the conjugation of reactive chemicals with glutathione, and are involved in protecting cells generating GSH conjugates (47). In our study, GST activity was significantly increased in heart homogenates after DHEA treatment in 3 and 24 month-old groups when compared to controls. This increased GST activity in both treated groups must reflect a direct xenobiotic effect of DHEA over this enzyme and its role. In general, a variety of products of oxidative metabolism such as organic peroxides appear to be natural substrates for GST (48).

Surprisingly, a decrease of hydrogen peroxide concentration and Nrf2 expression was observed in cardiac samples of 24 month-old groups when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. Hydrogen peroxide concentration was positively correlated with Nrf2 protein expression ( $r=0.62$ ,  $p=0.0064$ ). This positive correlation is well-established and corroborates the study of Ding and colleagues (20), which provide evidence that hydrogen peroxide generated during muscle differentiation contributes to the formation of myotubes via the activation of Nrf2/GSH redox signaling pathway. Changes in the intracellular GSH redox environment have been shown to affect many signaling pathways that participate in physiological responses from cell proliferation to redox-regulated gene expression. There is growing evidence that modifications in cellular redox balance toward prooxidative status leads to oxidation and facilitates translocation of Nrf2 to the nucleus, where it binds to the ARE regulatory region of phase 2 genes (49). This referenced study states that hydrogen peroxide performs dual functions: as a signal messenger molecule for muscle differentiation and as a mediator for antioxidant GSH synthesis via Nrf2 activation. Indeed, through the use of Nrf2-disrupted models (cells and mice), Kensler and co-workers have reported that Nrf2 protects against cell death induced by multiple oxidants – including hydrogen peroxide – mainly by alleviating cellular ROS levels (50). In our study, we measured only cytosolic fraction of proteins by western blot technique. However, whether evaluated the Nrf2 nuclear fraction, perhaps we could find increased Nrf2 nuclear expression - which would stimulate the increased GST, Akt and p-Akt expressions.

In our study, Trx-1 protein expression and thioredoxin reductase activity were not statistically different between groups, independently of age or treatment. The intracellular redox homeostasis capacity is substantiated primarily by glutathione and thioredoxin (19). The thioredoxin system consists of two antioxidant oxidoreductase enzymes: thioredoxin (Trx-1) and thioredoxin reductase. This system acts as a  $H_2O_2$  – scavenging system (14). In regard to the protocol used, we could suggest that GSH system was more involved and demanded than Trx system – represented by thioredoxin reductase activity and Trx protein expression.

GST expression was increased in 24 month-old groups when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. This increase in GST expression with age may be related to age-associated decrease in GSH/GSSG ratio. Such diminished redox ratio would stimulate the increased GST expression, as a compensatory mechanism, once its expression can be affected by altered ROS concentration.

Figure 3A presents the increase of Akt expression in 24 month-old groups when compared to 3 month-old groups, independently of treatment. Genetic analyses using various animal models have identified molecules that are primordial for aging. These include the insulin/Akt pathway between other metabolic pathways (5). One of the major functions of Akt is to promote growth factor-mediated cell survival and to block apoptosis (51). This effect was aging-dependent, suggesting that Akt concentration has increased as an answer to the aging development in order to avoid degenerative processes. Akt activity has been seen as a molecular interventional approach for treatment of cardiomyopathic damage resulting from debilitating changes of aging (52). Yet,



an increase in Akt phosphorylation is related to hypertrophy in human heart (53).

Also expression of p-Akt (Figure 3B) was enhanced in 24 month-old groups when compared to 3 month-old groups. Once Akt concentration was increased in the aged hearts, the rate of Akt phosphorylation has increased too. Akt and p-Akt protein expression alterations occurred in parallel to decreased GSH/GSSG ratio and to increased GSSG levels. Also a positive correlation between p-Akt expression and the GSSG levels was found ( $r= 0.7547$ ,  $p=0.0012$ ). It does not mean necessarily a cause-consequence interaction, but since Akt is a redox-sensitive protein (54, 55, 56) such age-related changes in this important redox index could be related to this protein activation. Yet, a relatively low concentration of ROS such as hydrogen peroxide and superoxide anion induces cell proliferation by ERK and Akt pathways largely through stimulation of growth-factors receptors (57).

DHEA significantly increased p-Akt expression in 24 month-old group when compared to its control. DHEA can act as a survival factor for bovine aortic endothelial cells by triggering the galphai-PI3K/Akt-Bcl2 pathway against apoptosis. Rapid and dose-dependent phosphorylation of Akt was the result of DHEA vascular protective effect (58). It probably means that aged rat hearts were more susceptible to DHEA effects, which stimulated a greater Akt phosphorylation.

Considering the results found, the aging process has responded differently to DHEA actions regarding to GSSG content, GPx activity and p-Akt concentration. Further studies are needed to form conclusions about the efficacy and the safety of DHEA replacement in the elderly, and it militates to a

better understand of DHEA net effect over oxidative stress parameters and its relation to Akt.

## REFERENCES

- (1) Genazzani AD, Lanzoni C, Genazzani AR. Might DHEA be considered a beneficial replacement therapy in the elderly? *Drugs Aging* 2007; 24 (3): 173-85.
- (2) Ledochowski M, Murr C, Jäger M, Fuchs D. Dehydroepiandrosterone, ageing and immune activation. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1739-47.
- (3) Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D. The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 774: 259-70.
- (4) Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C. The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis* 1996; 125(1): 1-13.
- (5) Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 2007; 100 (1): 15-26.
- (6) Nakamura T, Fox-Robichaud A, Kikkawa R, Kashiwagi A, Kojima H, Fujimiya M, Wong NC. Transcription factors and age-related decline in apolipoprotein A-1 expression. *J Lipid Res* 1999; 40: 1709-18.
- (7) Orentreich N, Brind JL, Rizler LR, Vogelman JH. Age-changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59(3): 551-5.
- (8) Arlt, W. Dehydroepiandrosterone and ageing. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18 (3): 363-80.

- (9) Agarwal S, Sohal RS. Aging and protein oxidative damage. *Mech Ageing Dev* 1994; 75(1): 11-9.
- (10) Yoshioka J, Schreiter ER, Lee RT. Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(11-12): 2143-51.
- (11) Jones, DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(9,10): 1865-79.
- (12) Bayorh MA, Ganfa AA, Socci RR, Silvestrov N, Abukhalaf IK. The role of oxidative stress in salt-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2004; 17(1): 31–6.
- (13) Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* 2003; 333(1): 19-39.
- (14) Altschmied J, Haendler J. Thioredoxin-1 and endothelial cell aging: role in cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal* 2009. Epub ahead of print.
- (15) Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(8): 1343-74.
- (16) Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(4): 443-53.
- (17) Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species- induced cell injury. *FEBS Lett* 2005; 579 (14): 3029-36.



- (18) Wu S, Li Q, Du M, Li S, Ren J. Cardiac-specific overexpression of catalase prolongs lifespan and attenuates ageing-induced cardiomyocyte contractile dysfunction and protein damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34 (1-2): 81-7.
- (19) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
- (20) Ding Y, Choi KJ, Kim JH, Han X, Piao Y, Jeong J, Choe W, Kang I, Ha J, Forman HJ, Lee J, Yoon K, Kim SS. Endogenous hydrogen peroxide regulates glutathione redox via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 downstream of phosphatidylinositol 3-kinase during muscle differentiation. *Am J Pathol* 2008; 172 (6): 1529-41.
- (21) Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(9): 1231-42.
- (22) Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2007; 20(3): 195-203.
- (23) DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 2006; 113(17): 2097-104.
- (24) Yildirim A, Gumus M, Dalga S, Sahin YN, Akcay F. Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant systems after renal ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33(4): 459-64.
- (25) Yoshimura M. Cardiac Aldosterone. *Nippon Rinsho* 2006; 64 (5): 837-42.

- (26) Pelissier MA, Muller C, Hill M, Morfin R. Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* 2006; 71(3): 240-8.
- (27) Aksoy Y, Yapanoglu T, Aksou H, Yildirim AK. The effect of dehydroepiandrosterone on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rabbits. *Urol Res* 2004; 32 (2): 93-6.
- (28) Nakamura S, Yoshimura M, Nakayama M, Ito T, Mizuno Y, Harada E, Sakamoto T, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Possible association of heart failure status with synthetic balance between aldosterone and dehydroepiandrosterone in human heart. *Circulation* 2004; 110 (13): 1787-93.
- (29) Leopold JA, Loscalzo J. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279 (5): H2477-85.
- (30) Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, Carvalho CR. The phosphatidylinositol/Akt/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life Sci* 2004; 76(1): 57-70.
- (31) Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anê GF, Amanso AM, Teixeira VP, Bordin S, Carpinelli AR, Britto LR, Barbieri RL, Borella MI, Carvalho CR. DHEA increases  $\beta$ -cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Lett* 2006; 580: 285-90.
- (32) Jacob MHVM, Janner DR, Jahn MP, Kucharski LCR, Belló-Klein A, Ribeiro MFM. DHEA effects on myocardial Akt signaling modulation and oxidative stress changes in aged rats. *Steroids* 2009; (DOI 10.1016/j.steroids.2009.08.005)

- (33) Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77: 373-82.
- (34) Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38 (1-2): 161-70.
- (35) Mannervick B, Gluthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol* 1981; 77: 231–5.
- (36) Flohé L, Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114–21.
- (37) Leong SF, Clark JB. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J* 1984; 218 (1): 131- 8.
- (38) Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1995; 252: 199-208.
- (39) Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (5259): 680-5.
- (40) Jacob MHVM, Janner DR, Belló-Klein A, Llesuy SF, Ribeiro MFM. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 112 (1-3): 138-44.
- (41) Laurine E, Lafitte D, Grégoire C, Sérée E, Loret E, Douillard S, Michel B, Briand C, Verdier JM. Specific binding of DHEA to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. *J Biol Chem* 2003; 278(32): 29979-86.
- (42) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 (1): 265–75.

- (43) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–54.
- (44) Sivonova M, Tatarikova Z, Durackova Z, Dobrota Z, Lehotsky J, Matakova T, Kaplan P. Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and DNA in aged rats. *Physiol Res* 2007; 56(6): 757-64.
- (45) Cordeiro AT, Thiemann OH, Michels PA. Inhibition of trypanosoma brucei G6PDH by human steroids and their effects on the viability of cultured parasites. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(6): 2483-9.
- (46) Schwartz AG, Pashko LL. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Res Rev* 2004; 3 (2): 171-87.
- (47) Fukuda A, Nakamura Y, Ohigashi H, Osawa T, Uchida K. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236 (2): 505-9.
- (48) Gümüslü S, Akbas H, Aliciguzel Y, Agar A, Kucukatay V, Yargicoglu P. Effects of sulfur dioxide inhalation on antioxidant enzyme activities in rat erythrocytes. *Ind Health* 1998; 36: 70-3.
- (49) Kweon M, Park IY, Sung H, Mukhtar H. The novel antioxidant 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf2-dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1349-61.
- (50) Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 89-116.



- (51) Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005; 9(1): 59-71.
- (52) Sussman M. "AKT"ing lessons for stem cells: regulation of cardiac myocyte and progenitor cell proliferation. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17(7): 235-40.
- (53) Jacobshagen C, Gruber M, Teucher N, Schimdt AG, Unsold BW, Toischer K, Nguyen VP, Maier LS, Kögler H, Hasenfuss G. Celecoxib modulates hypertrophic signaling and prevents load-induced cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2008; 10(4): 334-42.
- (54) Cai H, Li Z, Davis ME., Kanner W, Harrison DG., Dudley SC. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase  $\frac{1}{2}$  cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2003; 63 (2): 325-31.
- (55) Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71(2): 247-58.
- (56) Araujo A, Schenkel P, Enzweiler A, Fernandes T, Partata W, Llesuy S, Ribeiro M, Khaper N, Singal P, Belló-Klein A. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 2008; 41(6): 423-30.
- (57) Yoon S, Yun C, Chung A. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 1597-1604.
- (58) Liu D, Si H, Reynolds KA, Zhen W, Jia Z, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase-

Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. *Endocrinology* 2007; 148 (7): 3068-76.



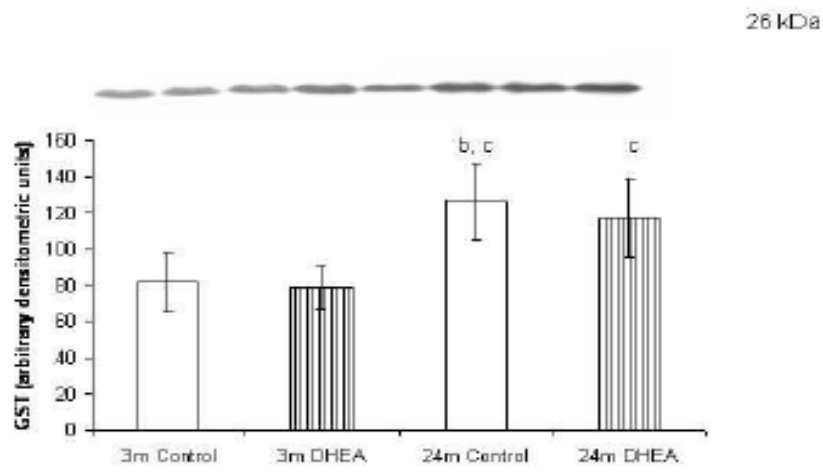
### Captions to figures:

**Figure 1:** Western blot analysis in cardiac homogenates after 5 weeks of 10 mg/kg DHEA treatment or control using GST (A) and Trx-1 (B) antibodies, followed by representative western blots (two bands for each group). Values are expressed as mean  $\pm$  SD, in arbitrary densitometric units. Two-way ANOVA followed by SNK. **b:** Significantly different from 3m, same treatment ( $P<0.05$ ); **c:** Significantly different from 3m, independently of treatment ( $P<0.05$ );

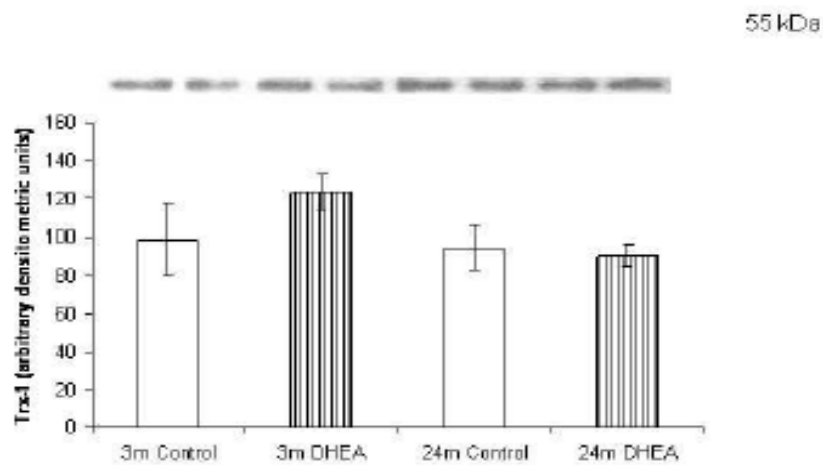
**Figure 2:** Hydrogen peroxide steady-state concentration (nmol/g tissue)(A) and western blot analysis using Nrf2 antibody (B), followed by representative western blots (two bands for each group) in cardiac tissue of different aging groups after DHEA treatment (10 mg/kg) or control. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Two-way ANOVA followed by SNK. **b:** Significantly different from 3m, same treatment ( $P<0.05$ ); **c:** Significantly different from 3m, independently of treatment ( $P<0.05$ );

**Figure 3:** Western blot analysis in cardiac homogenates after 5 weeks of 10 mg/kg DHEA treatment or control using Akt (A) and p-Akt (B) antibodies, followed by representative western blots (two bands for each group). Values are expressed as mean  $\pm$  SD, in arbitrary densitometric units. Two-way ANOVA followed by SNK. **a:** Significantly different from its control, same age ( $P<0.05$ ); **b:** Significantly different from 3m, same treatment ( $P<0.05$ ); **c:** Significantly different from 3m, independently of treatment ( $P<0.05$ );

Figure 1  
(A)

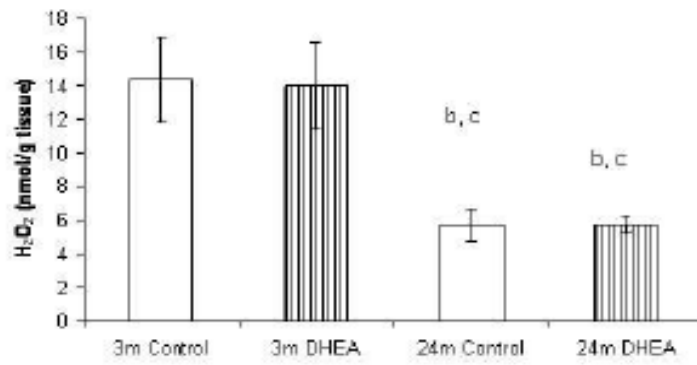


(B)

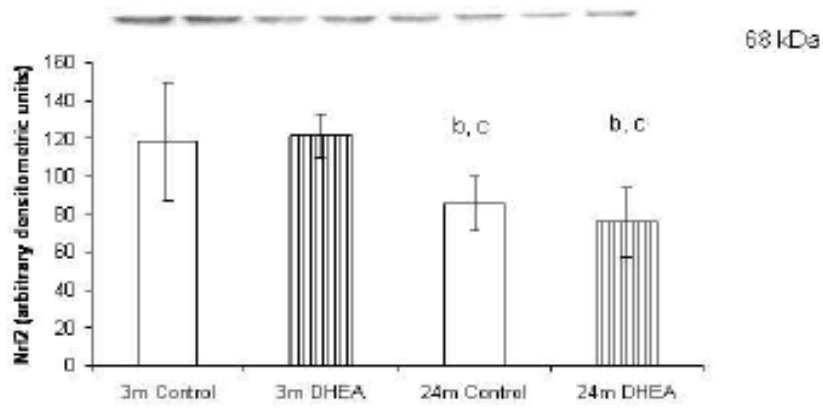


190x275mm (96 x 96 DPI)

Figure 2  
(A)

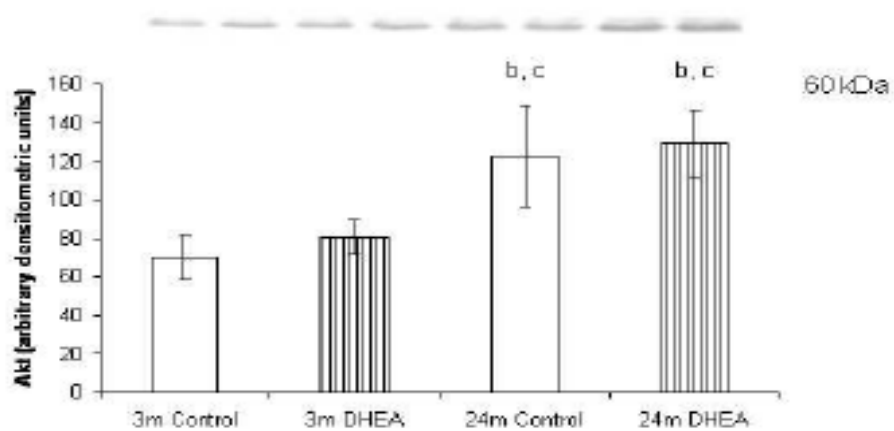


(B)

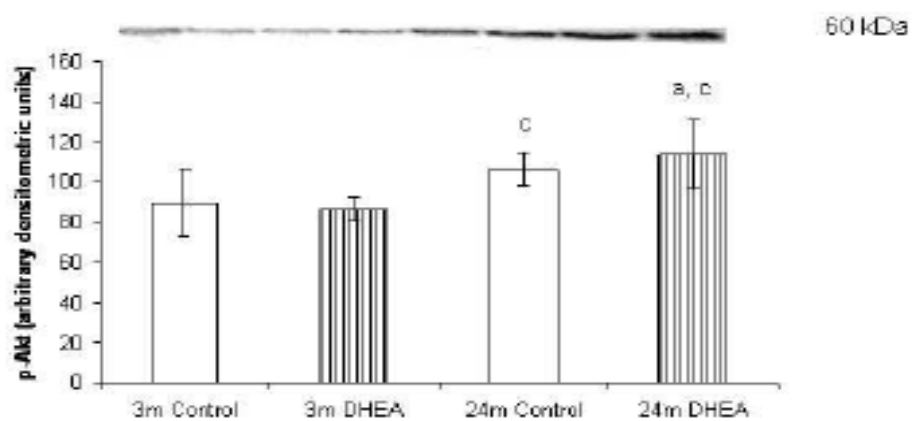


190x275mm (96 x 96 DPI)

Figure 3  
(A)



(B)



190x275mm (96 x 96 DPI)

**Table 1:** Effects over GSH total levels (GSH+GSSG), GSH (reduced glutathione), GSSG (oxidized glutathione) and GSH/GSSG ratio evaluated in heart homogenates of the different groups after DHEA treatment (10 mg/kg) or control.

Measurement/Group	3 month-old Control	3 month-old DHEA	24 month-old Control	24 month-old DHEA
GSH + GSSG (nmol/mg prot)	0.2545 ± 0.0614	0.2781 ± 0.0611	0.2559 ± 0.0532	0.1953 ± 0.0253
GSH (nmol/mg prot)	0.2472 ± 0.0620	0.2734 ± 0.1000	0.2468 ± 0.0520	0.1838 ± 0.0250
GSSG (nmol/mg prot)	0.0074 ± 0.0008	0.0048 ± 0.0011 <sup>a</sup>	0.0092 ± 0.0018 <sup>c</sup>	0.0115 ± 0.0024 <sup>a,b,c</sup>
GSH/GSSG ratio	33.96 ± 9.69	56.46 ± 11.17 <sup>a</sup>	27.45 ± 6.06 <sup>c</sup>	16.40 ± 3.92 <sup>b,c</sup>

Values are expressed as mean ± SD (n=6 per group). Two-Way ANOVA followed by SNK. a: Significantly different from its control, same age (P<0.05); b: Significantly different from 3m, same treatment (P<0.05); c: Significantly different from 3m, independently of treatment (P<0.05);

**Table 2:** Antioxidant enzyme activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S transferase (GST) and thioredoxin reductase (Trx) in heart homogenates from the different groups after DHEA treatment (10 mg/kg) or control.

Enzyme activity/Group	3 month-old Control	3 month-old DHEA	24 month-old Control	24 month-old DHEA
G6PDH (U/mg prot)	3.20 ± 0.29	2.51 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.36	2.85 ± 0.479
GPx (nmol/min/mg prot)	49.20 ± 8.83	63.70 ± 9.74 <sup>a</sup>	60.00 ± 9.76 <sup>c</sup>	36.10 ± 2.24 <sup>a,b,c</sup>
GST (μmol/min/mg prot)	13.23 ± 2.08	15.39 ± 1.13 <sup>d</sup>	14.00 ± 1.07	14.86 ± 1.55 <sup>d</sup>
Trx reductase (nmol TNB/min/mg prot)	12.39 ± 1.11	13.25 ± 2.25	13.75 ± 2.25	12.54 ± 1.43

Values are expressed as mean ± SD (n=6 per group). Two-Way ANOVA followed by SNK. a: Significantly different from its control, same age (P<0.05); b: Significantly different from 3m, same treatment (P<0.05); c: Significantly different from 3m, independently of treatment (P<0.05); d: DHEA groups significantly different from control groups (P<0.05);



## 6. DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Milhões de pessoas em todo mundo, principalmente na Europa e nos Estados Unidos continuam a usar a DHEA – a maioria sem prescrição médica – como um produto que diminui muitas deficiências fisiológicas ou como uma promessa de efeitos anti-envelhecimento (Kibaly et al, 2008). Outro fato relevante é o uso deste esteróide em doses farmacológicas ou suprafisiológicas por atletas e simpatizantes do fitness para fins de hipertrofia muscular (Labrie et al, 2006). Além disso, a terapia de reposição hormonal com DHEA, em idosos, homens e mulheres, aumentou a força muscular, a massa corporal e a libido, melhorou a pele, proporcionando melhor qualidade de vida e sensação de bem-estar (Baulieu et al., 2000). Entretanto, há muita controvérsia e a literatura ainda não disponibiliza dados suficientes para certificar sua recomendação.

No **primeiro** artigo publicado, foram verificadas mudanças em parâmetros de estresse oxidativo em diferentes janelas temporais agudas (6 e 24 horas) com distintas doses de DHEA (1, 10 e 50 mg/kg) nos corações de ratos adultos saudáveis. Este estudo objetivou verificar qual efeito tal esteróide produziria agudamente no miocárdio de ratos adultos saudáveis e o possível envolvimento da Akt neste modelo. As doses utilizadas na curva foram escolhidas com base nos dados da literatura, onde encontramos a dose mais utilizada sendo 50 mg/kg. Outros autores já tinham demonstrado que o aspecto temporal da administração de DHEA pode ter papel fundamental em relação ao estresse oxidativo. Aksoy e colegas mostraram que a DHEA (50 mg/kg) pode ter efeito benéfico no tecido renal quando administrada 3 horas antes do dano

de isquemia-reperfusão em coelhos, prevenindo a diminuição das atividades da SOD e CAT (2004). Entretanto, após dois dias administrando a mesma dose (50 mg/kg) Pelissier e seu grupo não encontraram nenhum efeito antioxidante da DHEA no homogeneizado de cólon, intestino ou fígado de ratos Wistar adultos saudáveis. Interessantemente, no mesmo estudo após 7 dias da mesma administração de DHEA, os parâmetros de estresse oxidativo estavam diminuídos nos mesmos tecidos, indicando um perfil antioxidante (2004). Em nosso primeiro artigo, as doses de 1 e 10 mg/kg promoveram uma resposta oxidativa nos homogeneizados cardíacos de ratos Wistar adultos após 6 horas, evidenciada pelo aumento significativo do dano oxidativo aos lipídios de membrana (QL) (69% e 98%, respectivamente) quando comparados ao grupo controle. Após 24 horas, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos em relação à QL. O aumento da atividade da SOD após 6 horas em todos os grupos, poderia refletir um aumento na concentração do radical superóxido, apesar de não termos medido tal espécie radical. Após 24 horas, o grupo 10 mg/kg teve redução (42%) da atividade da SOD em relação ao grupo controle, sugerindo diminuição na concentração do radical superóxido. Após 24 horas, os grupos 10 e 50 mg/kg tiveram a atividade da GST aumentada (55% e 43%, respectivamente) quando comparadas ao grupo controle. A GST pertence a uma família de enzimas que utilizam a glutatona para transformar vários compostos (carcinogênicos, fármacos terapêuticos e produtos do estresse oxidativo) (Pastore et al, 2003). Após 24 horas da administração de DHEA, a GST teve sua atividade aumentada possivelmente para detoxificar os produtos da lipoperoxidação, indicando a presença de estresse oxidativo. Os efeitos observados provavelmente não estão

diretamente relacionados à eliminação da DHEA, mas com a oscilação tempo-dependente da produção e metabolização das EAO. A concentração protéica das enzimas antioxidantes não teve diferença significativa em nenhum dos tempos provavelmente porque as EAO produzidas não foram suficientes para modificar a síntese destas proteínas. Outros fatores intracelulares poderiam influenciar a concentração destas enzimas, como a disponibilidade de substrato, a temperatura e o pH. O HNE é um indicador de oxidação de proteínas e lipídios que reage com os aminoácidos cisteína, histidina e lisina, formando os adutos de Michael (Uchida, 2003). O HNE também pode reagir não somente com proteínas de membrana celular, mas com elementos intracelulares como a glutathiona (Nakashima et al, 2003). Em nosso estudo, o HNE não apresentou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos administrados. Após 24 horas, o tratamento com DHEA 50 mg/kg aumentou 47% a razão p-Akt/Akt comparado ao grupo controle. Uma correlação positiva ( $r = 0.75$ ,  $p=0.0008$ ) entre a razão p-Akt/Akt e a concentração de HNE foi encontrada, sugerindo que o HNE poderia reagir com importantes proteínas intracelulares influenciando a via da Akt, resultando em um papel protetor desta proteína. Os produtos aumentados de LPO poderiam estar induzindo a fosforilação da Akt, que é uma via de sobrevivência celular. Wang e outros observaram que as EAO, como o peróxido de hidrogênio, são estimulantes da fosforilação da Akt e esta pode gerar um sinal para proteger as células contra o estresse oxidativo (2000). Guedes e colegas evidenciaram que as EAO estão envolvidas na dor neuropática desenvolvida em modelo animal, que causa ativação da Akt e também não muda a expressão de HNE após 24 horas (2008). Interessantemente, este estudo corrobora nossos resultados em

relação à Akt e HNE na mesma janela temporal. Cai e outros também demonstraram que a fosforilação da Akt pode ser mediada pelas EAO, como o peróxido de hidrogênio (2003). O conjunto destes dados sugere, portanto, que as EAO podem ser precursoras das alterações da Akt no miocárdio de ratos adultos tratados agudamente com DHEA, uma vez que o estresse oxidativo se instalou paralelamente à razão aumentada da p-Akt/Akt.

Várias evidências indicam que as reações oxidativas contribuem para muitas conseqüências do envelhecimento e para outras doenças, incluindo doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, diabetes, doenças neurodegenerativas e câncer (Jones, 2006). Estudos epidemiológicos mostram que doenças ateroscleróticas e a mortalidade cardiovascular estão inversamente associadas com a concentração de DHEA e DHEAS, principalmente em homens (Barrett-Connor e Goodman-Gruen, 1995; Alexandersen et al, 1996). A incidência e prevalência de doenças aterotrombóticas aumentam com o envelhecimento (Minamino e Komuro, 2007). Uma vez que o tratamento agudo com DHEA influenciou o status oxidativo e a Akt no miocárdio de ratos adultos saudáveis, o **segundo** artigo estudou a relação do estresse oxidativo com a Akt no miocárdio de ratos adultos e velhos, após administração crônica de DHEA. Observou-se no primeiro artigo que a dose 10 mg/kg teve um importante efeito em relação ao estresse oxidativo, e com base em outros estudos de tratamento crônico com esta dose, realizou-se o tratamento de 5 semanas. Foi demonstrado por este estudo que a concentração da p-Akt aumenta nos grupos tratados, independentemente da idade, e que a razão pAkt/Akt aumentou no grupo tratado de 18 meses quando comparado ao seu controle. Isto provavelmente

significa que o potencial protetor da Akt foi ativado como uma resposta ao tratamento crônico, especialmente demonstrado nos ratos velhos. A Akt (ou PKB) tem importante função nas vias de sinalização em resposta aos fatores de crescimento e a outros estímulos extracelulares para regular várias funções incluindo metabolismo, crescimento celular, sobrevivência e apoptose (Song et al, 2005). A atividade da Akt tem sido vista como uma ferramenta de intervenção molecular para o tratamento de cardiomiopatias resultantes do envelhecimento (Sussman, 2007). A DHEA pode agir como um fator de sobrevivência ativando a via da PI3K/Akt-Bcl-2 contra a apoptose. A DHEA produz efeito protetor vascular dependente da dose por meio da fosforilação da Akt (Liu et al, 2007).

Novamente a DHEA teve influência na fosforilação da Akt, como demonstrado no primeiro artigo, e tal efeito ocorreu paralelamente às mudanças nos níveis de EAO. Os grupos 18 meses tiveram aumento significativo de QL quando comparados aos grupos de 3 meses. Ambas técnicas utilizadas para acessar LPO (QL e concentração de HNE) avaliam diferentes fases deste processo. Apesar do aumento na QL – e não na concentração de HNE - pode ter acontecido um aumento na produção de LPO em uma fase intermediária (entre as idades estudadas), o que poderia resultar numa adaptação enzimática compensatória. Nossos resultados sugerem que a geração de produtos da LPO estava associada com a indução da atividade da GST, já que ambas medidas estavam aumentadas nos grupos 18 meses quando comparados aos grupos 3 meses. Os múltiplos compostos produzidos no processo de lipoperoxidação da membrana, os quais podem causar efeitos biológicos como doenças cardíacas, envelhecimento e câncer (Fukuda et al,

1997), estão possivelmente relacionados à indução da atividade da GST. O aumento da atividade da GST nos velhos indica, provavelmente, que os peróxidos – principalmente os orgânicos – estavam acumulados no miocárdio dos ratos velhos, reforçando que o aumento da QL, independentemente da DHEA, deve ser um efeito da idade. Esta diferente resposta específica da idade já está evidenciada na literatura em vários tecidos, incluindo o coração (Candi e Verdeti, 1989). A concentração de GST não apresentou diferença significativa, provavelmente pela influência de outros fatores intracelulares – fato este também encontrado no primeiro artigo. O tratamento com DHEA diminuiu significativamente a atividade da SOD, independente da idade. Provavelmente os grupos tratados tiveram a atividade desta enzima inibida por produtos de oxidação (Travacio e Llesuy, 1996). Este estudo apresentou mudanças nos parâmetros de estresse oxidativo em paralelo com as alterações na concentração da Akt. Isto não significa necessariamente uma interação causa-consequência, mas uma vez que as EAO são evidenciadas como moléculas sinalizadoras (Paravicini e Touyz, 2006; Cai et al, 2003; Araújo et al, 2008), tais mudanças no estresse oxidativo podem estar relacionadas à modulação desta proteína. A DHEA parece exercer ações tóxicas e/ou benéficas nas células não somente por meio do seu potencial anti ou oxidante, mas sim pela modulação de cascatas de sinalização.

O estresse oxidativo está envolvido numa série de processos patológicos e fisiológicos de vários tecidos, exercendo um papel importante no controle da função celular (Dröge, 2002). Além disso, dados da literatura apresentam, enfaticamente, a relação entre o envelhecimento e as EAO. Entretanto, esta correlação é pouco explorada no sangue, mesmo sendo um



tecido exposto constantemente ao estresse oxidativo pela auto-oxidação da hemoglobina. Os eritrócitos apresentam níveis elevados de ácidos graxos não-saturados, os quais constituem particularmente substratos preferenciais para as reações de peroxidação (Katherine et al, 1997). Os eritrócitos constituem um modelo valioso e importante para se observar os efeitos do envelhecimento celular, já que representam um marcador periférico (Nakamura et al, 2004). Um interesse clínico relevante na DHEA é baseado em muitas observações: 1) um importante declínio na sua produção com o passar dos anos; 2) evidências na literatura de que as mudanças nos níveis de DHEA estão associadas a muitas doenças; e 3) o grande uso de terapia de reposição hormonal com DHEA pode atenuar os declínios em diferentes funções associados à idade (Mo et al, 2006). A questão de investigar o efeito da DHEA sobre um marcador periférico – que pode refletir o equilíbrio entre os órgãos – foi sugerida para compararmos se os efeitos ocorridos no miocárdio seriam repetidos nos eritrócitos. Por conseguinte, no **terceiro** artigo, objetivou-se estudar os efeitos crônicos da DHEA sobre marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de ratos Wistar de diferentes idades (3, 13 e 18 meses). Neste estudo, o perfil da atividade da SOD, da LPO e a atividade da GST, em eritrócitos, foi o mesmo durante o envelhecimento, com aumento significativo no grupo 13 meses comparado com as outras idades, independentemente do tratamento. Possivelmente, a atividade da SOD aumentada no grupo 13 meses pode ter sido estimulada por uma produção aumentada do ânion superóxido, resultando na produção aumentada de peróxido de hidrogênio. Então, a atividade da CAT aumentada também nos 13 meses quando comparada aos grupos 3 e 18 meses, independente do tratamento, pode estar acontecendo pelo aumento de

substrato disponível (peróxido de hidrogênio). A atividade da SOD foi positivamente correlacionada com a atividade da CAT ( $r = 0.689$ ,  $p = 0.000018$ ). Este dado corrobora o estudo de Sohal e colegas (1990), que demonstrou que as atividades da SOD e CAT estavam positivamente correlacionadas no fígado, coração e encéfalo de diferentes espécies de mamíferos, incluindo ratos velhos. A importância desta relação é a capacidade coordenada das enzimas antioxidantes de varrer a geração de EAO, evitando o acúmulo do ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio. Durante o processo de envelhecimento, a atividade das enzimas antioxidantes depende de muitos fatores, como espécie, gênero, tecido e localização de enzimas subcelulares (Augustyniak e Skrzydlewska, 2004).

O grupo 13 meses tratado teve um aumento de 4 vezes na QL quando comparado ao seu controle. O grupo 13 meses tratado também apresentou aumento significativo na QL quando comparado aos grupos tratados de 3 e 18 meses. Ainda, a QL estava aumentada no grupo 13 meses quando comparado aos grupos 3 e 18 meses, considerando o fator idade. A LPO pode ser resultado de maior produção de EAO ou da diminuição das defesas antioxidantes. Entretanto, o aumento da LPO no grupo 13 meses pode ser resultado de aumento na produção de peróxido de hidrogênio, indicada pelo aumento na atividade da CAT. Öztürk e Gümüslü estudaram os níveis de LPO pela técnica de TBARS em eritrócitos de ratos velhos, encontrando maiores concentrações de TBARS nas idades mais avançadas (2004). Rodriguez-Martinez e colaboradores (1998) mediram os níveis de malondialdeído no plasma de ratos Sprague-Dawley de 6, 24 e 30 meses. Os níveis de malondialdeído estavam aumentados 2 e 3 vezes nos ratos de 24 e 30 meses,

respectivamente, quando comparados ao grupo 6 meses. Nossos resultados estão de acordo com os dados obtidos em outros estudos quando, no primeiro ano (próximo a 13 meses), mostrou-se um perfil de estresse oxidativo aumentado, enfatizado no grupo tratado. Há conflitos na literatura em relação à LPO durante o envelhecimento, possivelmente devido aos diferentes modelos animais, tecidos examinados e os métodos utilizados. A atividade da GST aumentada somente no grupo 13 meses – independente do tratamento- sugere que os compostos produzidos durante o processo de LPO estão relacionados a este aumento. Interessantemente, este mesmo grupo apresentou os maiores níveis de QL. O acúmulo de peróxidos orgânicos – gerados pela DHEA e pelo estresse oxidativo nesta idade – deve ter influenciado a capacidade da glutathione de manter as enzimas nas suas formas ativas – uma das suas funções mais importantes (Pastore et al, 2003). De acordo com nossos resultados, era esperado que o grupo 18 meses fosse o mais debilitado. No entanto, nesta idade os parâmetros de estresse oxidativo estavam similares ao grupo 3 meses. Surpreendentemente, a literatura tem documentado resultados similares, nos quais o estresse oxidativo pode estar atenuado em animais de idade avançada quando comparado a outras fases do envelhecimento, dependendo do tecido e estrutura (Wu et al, 2007; Tian et al, 1998; Coling et al, 2009). Com base em nossos resultados, provavelmente o grupo 18 meses conseguiu normalizar suas defesas após uma situação de estresse oxidativo observada aos 13 meses. A partir dos dados obtidos, parece que a idade de 13 meses é quando um dano originado pelas EAO está acumulado, e o aumento das atividades das enzimas antioxidantes não foram suficientes para combater o aumento da LPO nesta idade.

Estes dados abriram a perspectiva de estudar mais profundamente o envolvimento do estresse oxidativo no envelhecimento, e o mecanismo pelo qual as EAO estão envolvidas na modulação das vias de sinalização intracelular sensíveis ao estado redox. Desta forma, um dos objetivos do **quarto** artigo foi avaliar os efeitos da DHEA sobre o estresse oxidativo no coração de ratos adultos e em ratos mais velhos (24 meses), e verificar se tais mudanças estariam associadas às alterações no estado redox. Também era objetivo, correlacionar a concentração do peróxido de hidrogênio à possível modulação da expressão de proteínas redox-sensíveis. A maior contribuição deste estudo foi demonstrar que a DHEA tem efeitos diferentes sobre o coração de ratos adultos e velhos, e que estes apresentam diferente sensibilidade ao tratamento com DHEA. O aumento significativo dos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) e a diminuição da razão glutathiona reduzida/oxidada (GSH/GSSG) nos grupos 24 meses quando comparados aos adultos - independentemente do tratamento – corrobora a afirmação de que a geração aumentada de radicais livres e o enfraquecimento das defesas antioxidantes devem estar fortemente relacionados ao desenvolvimento do envelhecimento. Em contrapartida, os sistemas de defesa antioxidante tiveram de adaptar-se, e estas mudanças poderiam estar expressas pela atividade da GPx e pela concentração protéica da GST e da Akt. O estresse oxidativo provoca perturbações nos níveis de glutathiona afetando a biossíntese ou alterando a razão intracelular GSH/GSSG que afeta muitas respostas fisiológicas (Harvey et al, 2009). Em nosso último artigo, a quantidade de GSSG estava aumentada nos grupos velhos, e isto era esperado pelo próprio processo de envelhecimento. Sivonová e colegas (2007) observaram um declínio na

capacidade antioxidante no coração junto a uma perda significativa do conteúdo sulfidril total e aumento da LPO em ratos machos Wistar velhos (15 e 26 meses). Em nosso estudo, a DHEA aumentou os níveis de GSSG no grupo 24 meses quando comparado ao seu grupo controle e quando comparado ao grupo adulto tratado. Entretanto, ao comparar ambos grupos de 3 meses, este esteróide diminuiu os níveis de GSSG, tendo outro perfil sobre o coração de ratos adultos jovens. A razão GSH/GSSG estava diminuída nos grupos 24 meses quando comparados aos grupos 3 meses – independente do tratamento – pelo aumento dos níveis de GSSG nos ratos velhos. Tais resultados estão relacionados com os níveis de GSSG e seu acúmulo durante o processo de envelhecimento.

A enzima glicose-6- fosfato desidrogenase (G6PDH) é uma importante fonte de NADPH, o qual é essencial como cofator para a conversão de GSSG a GSH pela glutathione redutase (GR) para restaurar o estado redox intracelular. Estudos com DHEA relatam a importância da inibição da G6PDH na redução da inflamação, hiperplasia, carcinogênese, indicando que a inibição desta enzima pode retardar a taxa de desenvolvimento de doenças relacionadas à idade (Schwartz e Pashko, 2004). Em nosso estudo, o grupo 3 meses tratado teve a atividade da G6PDH diminuída quando comparada ao seu controle. Tal resposta pode estar relacionada à menor necessidade de regeneração de glutathione no grupo 3 meses, já que menos GSSG foi gerada, resultando em menor disponibilidade de substrato para sua atividade. Sabe-se que a DHEA pode inibir a atividade da G6PDH, e isto é importante ao comparar ambos os grupos 3 meses (Schwartz e Pashko, 2004). Outra enzima importante é a GPx. Considerando somente os grupos velhos, a DHEA

diminuiu a atividade da GPx, enquanto no grupo adulto aumentou a atividade da mesma quando comparado ao seu grupo controle. A DHEA diminuiu a atividade desta enzima no grupo 24 meses quando comparado ao grupo 3 meses tratado. Novamente, demonstramos que os animais velhos tiveram resposta diferente ao tratamento com o esteróide estudado em relação aos jovens. A atividade aumentada da GST em ambos os grupos tratados reflete um efeito xenobiótico direto da DHEA sobre esta enzima e sobre sua função. Em geral, vários produtos do metabolismo oxidativo, como os peróxidos orgânicos, parecem ser substratos naturais para a GST (Gümüslü et al, 1998).

Surpreendentemente, a concentração de peróxido de hidrogênio e a expressão de Nrf2 estavam diminuídas nos tecidos cardíacos dos ratos velhos quando comparados aos ratos adultos, independentemente do tratamento. A concentração de peróxido de hidrogênio foi positivamente correlacionada com a expressão de Nrf2. Essa relação está bem estabelecida e corrobora o estudo de Ding e outros (2008), que mostraram que o peróxido de hidrogênio, produzido durante a diferenciação muscular, contribui para a formação de miotúbulos pela ativação da via de sinalização redox GSH/Nrf2. Alterações da glutathiona no meio redox intracelular podem afetar muitas vias de sinalização que participam em respostas fisiológicas, desde a proliferação celular até a expressão gênica regulada pelo estado redox. Modificações no equilíbrio redox celular em direção ao estado pro-oxidante leva à oxidação e facilita a translocação do Nrf2 para o núcleo, onde este se liga ao elemento responsivo a antioxidantes (ARE) (Kweon et al, 2006). O Nrf2 protege contra a morte celular induzida por múltiplos oxidantes – incluindo o peróxido de hidrogênio – principalmente por atenuar os níveis de EAO celular (Kensler et al, 2007). Em



nosso estudo, mediu-se a fração citosólica das proteínas pela técnica de western blot. Entretanto, se avaliada a fração nuclear, talvez a concentração de Nrf2 estivesse aumentada, a qual poderia ser o estímulo para as concentrações aumentadas de GST, Akt e p-Akt.

A concentração da tiorredoxina-1 e a atividade da tiorredoxina redutase não foram diferentes estatisticamente entre os grupos, independentemente da idade ou do tratamento. De acordo com o protocolo usado, sugere-se que o sistema de glutathione estava mais envolvido e exigido do que o sistema da tiorredoxina – representado pela concentração da tiorredoxina-1 e pela atividade da tiorredoxina redutase.

A concentração da GST estava aumentada nos grupos 24 meses quando comparados aos grupos 3 meses, independente do tratamento. Este aumento com a idade pode estar relacionado à diminuição da razão GSH/GSSG associado à idade. Esta diminuição da razão GSH/GSSG poderia estimular o aumento na concentração de GST, como um mecanismo compensatório, já que sua expressão pode ser afetada pela concentração alterada de EAO.

O aumento na concentração da Akt nos grupos 24 meses quando comparado aos grupos 3 meses, independente do tratamento, novamente evidencia um efeito dependente da idade. Sugere-se que este aumento na Akt é uma resposta ao desenvolvimento do envelhecimento, procurando evitar outros processos degenerativos. Houve também aumento na concentração da p-Akt nos grupos 24 meses quando comparado aos grupos 3 meses, independente do tratamento. Uma vez que a concentração da proteína aumentou nos ratos velhos, a taxa de fosforilação aumentou também. As

alterações na concentração da Akt e da p-Akt ocorreram em paralelo à diminuição da razão GSH/GSSG e ao aumento da GSSG. Foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração de p-Akt e os níveis de GSSG. Este fato não significa uma interação causa-conseqüência, mas sendo a Akt uma proteína redox-sensível, tais mudanças relacionadas à idade e aos níveis de GSSG podem estar associadas à ativação desta proteína. A baixa concentração de EAO, como o peróxido de hidrogênio, e o ânion superóxido, induz a proliferação celular pelas vias da ERK e da Akt, por meio da estimulação dos receptores dos fatores de crescimento (Yoon et al, 2002). A DHEA aumentou a concentração da p-Akt no grupo 24 meses comparado ao seu controle. Nosso resultado sugere que os corações dos ratos velhos estavam mais suscetíveis ao efeito da DHEA, a qual estimulou uma maior fosforilação.

Os resultados obtidos por meio destes experimentos indicam um cenário em que a DHEA parece modular proteínas redox-sensíveis, bem como exerce diferentes efeitos em relação ao estresse oxidativo dependendo da idade. Se a DHEA deve ser considerada anti ou prooxidante não é a questão central. A DHEA exerce ações benéficas e/ou tóxicas nos tecidos não somente por meio do seu potencial como anti ou prooxidante, mas por ter a capacidade de modular vias de sinalização como a Akt. É fundamental esta nova visão em relação ao estresse oxidativo, uma vez que seu conceito tem sido redefinido. Jones (2006) estabelece que o acúmulo de dados sobre as vias de sinalização redox, intervenções em ensaios com antioxidantes, e marcadores de estresse oxidativo indicam que uma definição mais proveitosa e contemporânea para o conceito de estresse oxidativo é “a interrupção do controle e da sinalização

redox”. Sabe-se que as conseqüências benéficas e/ou tóxicas das EAO sugerem um conceito simples como o “distúrbio no equilíbrio entre prooxidantes e antioxidantes”, e este é um conceito de mais de 20 anos. Simultaneamente, os sistemas enzimáticos evoluíram para produzir espécies reativas para a sinalização biológica, reações biosintéticas, defesa química e funções de detoxificação (Jones, 2006). Estes outros aspectos ajudam a justificar este novo conceito e sua naturalidade frente às abundantes evidências na literatura.

Conclui-se que a DHEA como promessa de hormônio “anti-envelhecimento” é uma perigosa imagem que é vendida e bastante utilizada em várias partes do mundo, seja na reposição hormonal feminina e masculina, seja como suplemento nutricional em academias. Mostrou-se neste estudo que a DHEA pode alterar o perfil oxidativo celular, modulando a expressão de proteínas envolvidas na sinalização celular. O uso indiscriminado deste hormônio poderia alterar estas vias de maneira a produzir adaptações inadequadas ou não necessariamente benéficas ao organismo.

## **7. PERSPECTIVAS**

Embora os resultados apontem para uma clara participação da DHEA influenciando as EAO na modulação das vias de sinalização intracelular, outros experimentos seriam necessários para definir mais especificamente o papel deste esteróide em relação aos radicais livres e ao controle da ativação e expressão das proteínas destas e de outras vias de sinalização envolvidas no envelhecimento. Poderiam ser realizados:

- a avaliação *in vitro* do efeito da DHEA, avaliando outras vias intracelulares;
- a avaliação em fêmeas durante o envelhecimento, repetindo os protocolos utilizados nos machos;
- o uso de modelos patológicos, como o Diabetes Mellitus;
- a avaliação de outros tecidos (sistema nervoso central, fígado, rim, músculo esquelético)

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121–6.

Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981; 77:373-82.

Aksoy Y, Yapanoglu T, Aksou H, Yildirim AK. The effect of dehydroepiandrosterone on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rabbits. *Urol Res* 2004; 32 (3): 93-6.

Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C. The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis* 1996; 125: 1-13.

Altschmied J, Haendler J. Thioredoxin-1 and endothelial cell aging: role in cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal* 2009; Epub ahead of print.

Araujo A, Schenkel P, Enzweiler A, Fernandes T, Partata W, Llesuy S, Ribeiro M, Khaper N, Singal P, Belló-Klein A.. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 2008; 41(6): 423-30.

Arlt W. Dehydroepiandrosterone and ageing. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18 (3): 363-80.

Arnlöv J, Pencina MJ, Amin S, Nam BH, Benjamin EJ, Murabito JM, Wang TJ, Knapp PE, D'Agostino RB, Bhasin S, Vasan RS. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease incidence in men. *Ann Intern Med* 2006; 145 (3) 176-84.

Augustyniak A, Skrzydlewska E.. Antioxidative abilities during aging. *Postepy Hig Dosw* 2004; 58: 194-201

Bácsi K, Kósa J, Lazáry A, Horváth H, Balla B, Lakatos P, et al. Significance of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in different diseases. *Orvosi Hetilap* 2007; 148 (14): 651-7.

Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D. The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 774: 259-70.

Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. Neurosteroids: beginning the story. *Int Rev Neurobiol* 2001; 46: 1-32.

Baulieu, EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA): A fountain of youth? *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(9): 3147-51.



Baulieu, EE. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52: 1-32.

Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, Lahlou N, Roger M, Debuire B, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge study to a sociomedical issue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4279-84.

Belló-Klein A. Ação da vitamina A e do Trolox sobre o stress oxidativo produzido pelo peróxido de oxigênio no miocárdio isolado de rato (tese de doutorado). UFRGS, 1993.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–54.

Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SC. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase  $\frac{1}{2}$  cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 325-31.

Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, et al. The phosphatidylinositol/Akt/atypical PKC pathway is involved in the improved

insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life Sci* 2004; 76(1), 57-70.

Candi F, Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic Biol Med* 1989; 7(1): 59–63.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59(3): 527-625.

Coling D, Chen S, Chi LH, Jamesdaniel S, Henderson D. Age-related changes in antioxidant enzymes related to hydrogen peroxide metabolism in rat inner ear. *Neurosci Lett*. 2009; 464 (1): 22-25.

Compagnone NA, Mellon SH. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(8): 4678-83.

Corpechót C, Robel P, Axelson M, Sjörvall J, Baulieu EE. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 4704-7.

DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 2006; 113 (17): 2097-2104.

Del Maestro RF. An approach to free radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiol Scand* 1980; 40(7): 153-68.

Ding, Y, Choi KJ, Kim JH, Han X, Piao Y, Jeong J, et al. Endogenous hydrogen peroxide regulates glutathione redox via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 downstream of phosphatidylinositol 3-kinase during muscle differentiation. *Am J Pathol* 2008; 172 (6): 1529-41.

Drabkin DL, Austin J. Spectrophotometric studies: preparation from washed blood cells, nitric oxide haemoglobin and sulfahaemoglobin. *J Biol Chem* 1935; 112: 51-7.

Dröge W. The plasma redox state and ageing. *Ageing Res Rev* 2002; 1 (2): 257-78.

Favier AE. How to demonstrate the occurrence of an oxidative stress in human? In: Favier et al (eds). *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkhauser Verlag. Basel, 1995.

Finch CE. The regulation of physiological changes during mammalian aging. *Q Rev Biol* 1976; 51: 49-83.

Flohé L, Gunzler WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114–21.

Fraga CG, Onuki J, Lucesoli F, Bechara EJH, Di Mascio P. 5- Amino levulinic acid mediates the in vivo formation of 8-hidroxi-2´deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis* 1994; 15(10): 2241-44.

Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedicts G. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 2000; 35: 879-96.

Fridovich I. Superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 44: 147-57, 1975.

Fukuda A, Nakamura Y, Ohigashi H, Osawa T, Uchida K. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 505-9.

Gallo M, Aragno M, Gatto V, Tamagno E, Brignardello E, Manti R, et al. Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 35-9.

Genazzani AD, Lanzoni C, Genazzani AR. Might DHEA be considered a beneficial replacement therapy in the elderly? *Drugs Aging* 2007; 24 (3): 173-85.

Gillham B, Papachristodoulou DK, Thomas JH. *Will's Biochemical Basis of Medicine*. 3<sup>rd</sup> Edition. Butterworth & Heinemann, Oxford, 1997.

Ginaldi L, Sternberg H. The immune system. In: *Physiological basis of aging and geriatrics* (3<sup>rd</sup> edition), edited by Timiras PS. Boca Raton, FL: CRC, 2003.

Guedes RP, Araújo ASR, Janner D, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Partata WA. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell Mol Neurobiol* 2008, 28(8): 1049-56.

Gümüslü S, Akbas H, Aliciguzel Y, Agar A, Kucukatay V, Yargicoglu P. Effects of sulfur dioxide inhalation on antioxidant enzyme activities in rat erythrocytes. *Ind Health* 1998; 36: 70-3.

Habig WH, Pabst MJ, Jakobi WB. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22): 7140-7.

Haldane, JBS. *New paths in genetics*. London: Allen & Unwin, 1941.

Halliwell B, Gutteridge JCM. Free radicals in Biology and Medicine. 3<sup>th</sup> Edition. Oxford University Press, 1999.

Halliwell B. Antioxidants: The basis- what they are and how to evaluate them. In: SIES, H (ed): Antioxidants in diseases: mechanisms and therapy. Advances in Pharmacology. Vol 38. Academic Press, California, 1997.

Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? Cardiovasc Res 2000; 47(3): 410-8.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 1956; 2: 298:300.

Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. Faseb Journal 1992; 6: 2675-83.

Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. Free Radic Biol Med 2009; 46(4): 443-53.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1965; 37: 614-36.

Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. Methods Enzymol 1995; 252: 199-208.



Jacobshagen C, Gruber M, Teucher N, Schimdt AG, Unsold BW, Toischer K, et al. Celecoxib modulates hypertrophic signaling and prevents load-induced cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail* 2008; 10(4): 334-42.

Jones D. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1865-79.

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

Kanungo MS. A model fro ageing. *J Theor Biol* 1975; 53: 253-61.

Katherine AS, Thomas P, LaBerge W, Thomas J. In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22: 835-42.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2007;47: 89-116.

Khaw KT. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulphate and cardiovascular disease. *J Endocrinol* 1996; 150 (S) 149-53.

Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 36(1): 59-66.

Kibaly C, Meyer L, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *FASEB J* 2008; 22 (1): 93-104.

Komesaroff PA. Unravelling the enigma of Dehydroepiandrosterone: moving forward step by step. *Endocrinology* 2008, 149(3): 886-8.

Kurata K, Takebayashi M, Morinobu S, Yamawaki S.  $\beta$ -Estradiol, DHEA, DHEAS protect against N-methyl-D-aspartate- induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 237-45.

Kweon M, Park IY, Sung H, Mukhtar H. The novel antioxidant 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf2-dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1349-61.

Labrie F, Luu-The V, Martel C, Chernomoretz A, Calvo E, Morissette J, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 100: 52-8.

Lamberts SWJ, Van Der Beld AW, Van Der Lely AJ. The endocrinology of aging. *Science* 1997; 278: 419-24.

Lapchak PA, Araujo, DM. Preclinical development of neurosteroids as neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Int. Rev. Neurobiol* 2001; 46:379-97.

Legrain S, Girard L. Pharmacology and therapeutic effects of dehydroepiandrosterone in older subjects. *Drugs Aging* 2003; 20(13): 949-67.

Leong SF, Clark J.B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem. J.* 1984; 218: 131–138.

Leopold JA, Loscalzo J. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279, H2477-85.

Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to G $\alpha_{i2,3}$ . *J Biol Chem* 2002; 277: 21379-88.

Liu D, Si H, Reynolds KA, Zhen W, Jia Z, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. *Endocrinology* 2007; 148 (7): 3068-76.

Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimycin in mice. *Tumori* 1985; 71: 241-9.

Loison A, Festa-Bianchet M, Gaillard JM, Jorgenson JT, Jullien JM. Age-specific survival in five populations of ungulates: evidence of senescence. *Ecology* 1999; 80: 2539-54.

Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.

Mannervick B, Gluthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol* 1981; 77: 231-5.

Marklund SL. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald, R.A. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, Florida 1985, 243-7.

Marks DB, Marks AD, Smith CM. *Basic medical biochemistry: a medical approach*. 1<sup>st</sup> edition. Williams & Wilkins. Baltimore, 1996.

Meikle AW, Dorchuck RW, Araneo BA, Stringham JD, Evans TG, Spruance SL, Daynes RA. The presence of dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. *J Biochem Mol Biol* 1992; 42: 293-304.

Meneghini R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*. Volume 5, numero 28, 1987.

Migeon CJ., Keller AR, Lawrence B, Shepard TH. Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma: effect of age, sex, day-to-day and diurnal variation. *J Clin Endocrinol Metab* 1957; 17: 1051-62.

Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 2007; 100 (1): 15-26.

Mo Q, Lu S, Simon NG. Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 99: 50-58.

Mühlen D, Laughlin GA, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. The Dehydroepiandrosterone and wellness (DAWN) study: research design and methods. *Contemp Clin Trials* 2007, 28: 153-168.

Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2007; 20 (3): 195-203.

Nakamura S, Yoshimura M, Nakayama M, Ito T, Mizuno Y, Harada E, Sakamoto T, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Possible association of heart failure status with synthetic balance between aldosterone and dehydroepiandrosterone in human heart. *Circulation* 2004; 110: 1787-93.

Nakamura T, Fox-Robichaud A, Kikkawa R, Kashiwagi A, Kojima H, Fujimiya M, et al. Transcription factors and age-related decline in apolipoprotein A-1 expression. *J Lipid Res* 1999; 40: 1709-18.

Nakashima I, Liu W, Akhand AA, Takeda K, Kawamoto Y, Kato M, Suzuki H. 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *Mol Aspects Med* 2003; 24 (4-5): 231-8.

Nippoldt TB, Nair KS. Is there a case for DHEA replacement? *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998; 12(3): 507-20.

Okabe T, Haji M, Takayanagi R, Adachi M, Imasaki K, Kurimoto F, Watanabe T, Nawata H. Up-regulation of high affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J Clinical Endoc Metab* 1995; 80(10): 2993-6.

Orentreich N, Brind JL, Rizler LR, Vogelmann JH. Age-changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 551-55.

Óztürk O, Gümüslü S.. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, cooper, zinc-superoxide dismutase and catalase activities, glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. *Exp Gerontol* 2004; 39: 211-16.

Paravicini TM, Touyz R.M. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71(2), 247-58.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 19-39.

Pelissier MA, Trap C, Malewiak MI, Morfin R. Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7- $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids* 2004; 69: 137-144.

Picard J, Breton M, Deudon E. The role of arterial wall proteoglycan in arteriosclerosis. *La Semaine des Hôpitaux* 1979; 55: 748-52.

Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38: 161-70.

Pincemail J. Free radicals and antioxidants in human diseases. In FAVIER et al (eds). *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Birkhauser Verlag. Basel, 1995.

Punchard NA, Kelly FJ. *Free radicals, A Practical Approach*. IRL Press- Oxford University Press, Oxford, 1996.



Rabijewski M, Zgliczynski W. Positive effects of DHEA therapy on insulin resistance and lipids in men with angiographically verified coronary heart disease – preliminary study. *Endokrynol Pol* 2005; 56(6): 904-10.

Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llessuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 107-17.

Reusch CE. Hypoadrenocorticism. In S.J. Feldman & E. Ettinger. *Textbook of Veterinary internal medicine* (p. 1488-1499). St Louis, Missouri, Elsevier Saunders, 2005.

Rhoades R, Pflanzer R. *Human Physiology*. 2<sup>nd</sup> edition. Saunders College Publishing, Fort Worth, 1992.

Ribeiro MF, Garcia-Segura, LM. Dehydroepiandrosterone regulates Insulin-like Growth Factor-1 System in Adult rat Hypothalamus. *Endocrine* 2002, 17(2): 129-134.

Roberts E. The importance of being dehydroepiandrosterone sulfate (in the blood of primates). *Biochem Pharmacol* 1999; (57) 329-46.

Robinzon B, Michael KK, Ripp SL, Winters SJ, Prough RA. Glucocorticoids inhibit interconversion of 7-hydroxy and 7-oxo metabolites of dehydroepiandrosterone. *Arch. Biochem. Biophys* 2003; 412: 251-8.

Rodríguez-Martínez MA, Alonso MJ, Redondo J, Salaíces M, Marín J. Role of lipid peroxidation and the glutathione-dependent antioxidant system in the impairment of endothelium-dependent relaxations with age. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 113-21.

Sale EM, Sale GJ. Protein kinase B: signaling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(1): 113-27.

Scheid MP, Woodgett JR. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* 2003; 546: 108-12.

Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud F, Robel P, De Nicola AF, Baulieu EE. Steroids synthesis and metabolism in the nervous system: Trophic and protective effects. *J Neurocytol* 2000; 29:307-26.

Schwartz AG, Pashko LL. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 171-87.

Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B. Biol* 1991; 8:211-24.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (9/10): 916-21.

Sivonova M, Tatarkova Z, Durackova Z, Dobrota D, Lehotsky J, Matakova T, et al. Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and DNA in aged rats. *Physiol Res* 2007; 56: 757-64.

Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech Ageing Dev* 1990; 53(3): 217-27.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1): 59-71.

Souza-Rabbo MP, Araújo AS, Fernandes TR, Oliveira AR, Belló-Klein A, Kaur K, Singal PK. Influence of exercise training frequency on cardiac and hepatic oxidative stress in rats. *Exp Clin Cardiol*. 2003 Winter;8(4):201-205.

Sussman M. "AKT"ing lessons for stem cells: regulation of cardiac myocyte and progenitor cell proliferation. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17(7): 235-40.

Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(9): 1231-42.

Thomas CE. Approaches and rationale for the design of synthetic antioxidants as therapeutic agents. In: PACKER, L (ed). Handbook of Synthetic Antioxidants. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.

Tian L, Cai Q, Wei H.. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. Free Radic. Biol. Med 1998; 24 (9): 1477-84.

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR, Huang P. Redox regulation of cell survival. Antioxid Redox Signal 2008; 10(8): 1343-74.

Travacio M, Llesuy S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. J.Br.Assoc.Adv. Sci 1996; 48: 9-13.

Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. Prog Lipid Res 2003; 42(4): 318-43.

Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA, a review. Mutat Res 1988; 195: 137-49.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Manzur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 44-84.

Wang MJ, Huang HM, Chen HL, Kuo JS, Jeng KC. Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. *J Neurochem* 2001; 77(3): 830-8.

Wang X, McCullogh KD, Franke TF, Holbrook NJ. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 2000; 275(19): 14624-31.

Webb SJ, Geoghegan TE, Prough RA, Michael-Miller KK. The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug Metab Rev* 2006; 38:89-116.

Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1706-16.

Widstrom RL, Dillon JS. Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulphate? *Seminars in Reproductive Medicine* 2004; 22:289-98.

Williams MRI, Ling S, Dawood T, Hashimura K, Dai A, Li H, Liu JP, Funder JW, Sudhir K, Komesaroff PA. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of Ang II and EGF. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002; 87: 176-181.

Wu S, Ruan Y, Yin M, Lai W. Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone. *Gerontology* 2007; 53(4): 234-7.

Xilouri M, Papazafiri P. Anti-apoptotic effects of allopregnenolone on P19 neurons. *Eur J Neurosci* 2006; 23(1): 43-54.

Yamada Y, Sekihara H, Omura M, Yanase T, Takayanagi R, Mune T, et al. Changes in serum sex hormone profiles after short-term low-dose administration of DHEA to young and elderly persons. *Endocri J* 2007, 54: 153-62.

Yoon S, Yun C, Chung A. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 1597-1604.

Yoshioka J, Schreiter ER, Lee R T. Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(11): 2143-51.

Yu PB. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74(1): 139-62.

Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against

reactive oxygen and nitrogen species- induced cell injury. FEBS Lett 2005; 579:  
3029-36.