

Joana Rita Marques Mota

O PAPEL DOS NEUROSTEROIDES NA DEPRESSÃO E ANSIEDADE

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientado pelo Professor Doutor Alcino Leitão e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Rita Marques Mota

O PAPEL DOS NEUROSTEROIDES NA DEPRESSÃO E ANSIEDADE

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientado pelo Professor Doutor Alcino Leitão e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O Orientador de Estágio

(Professor Doutor Alcino Leitão)

A Estagiária

(Joana Rita Marques Mota)

Eu, Joana Rita Marques Mota, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010136182, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, _____ de _____ de 2016.

Joana Rita Marques Mota

Agradecimentos

“ Os ideais que iluminaram o meu caminho são a bondade, a beleza e a verdade.”
Albert Einstein

O meu percurso académico além de um grau académico superior trouxe-me grandes ensinamentos a nível pessoal e momentos difíceis que sem o apoio de algumas pessoas não teria conseguido ultrapassar. Todos deram vida ao meu percurso, e me fizeram crescer enquanto pessoa e profissional. Como tal, não poderia deixar de agradecer:

Ao Professor Doutor Alcino Leitão por ter aceite ser meu orientador e por todo o auxílio prestado.

Aos meus pais, por toda a dedicação, esforço, paciência e momentos encorajadores, não só durante o meu percurso académico, mas durante toda a minha vida.

Ao meu irmão João, à minha cunhada Cátia que foram sempre um ombro amigo, companheiros, bons ouvintes e por toda a dedicação e proteção que o João sempre teve por mim.

Aos meus avós, que sempre me apoiaram, com muita paciência, compreensão e que sempre tiveram uma palavra carinhosa de encorajamento.

Aos meus colegas de faculdade, que me proporcionaram bons momentos, de companheirismo amizade e alegrias.

À Mariana, pela nossa grande amizade, pelos seus conselhos e por todo o seu afeto.

A todos, agradeço do fundo do coração.

Lista de Abreviaturas

ACTH: Hormona Adrenocorticotrófica

ADME: Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção

alloP : Alopregnanolona

ANT: Transportador Adenina Nucleotídico

SNC: Sistema Nervoso Central

CRF: Fator de Libertação da Corticotrofina

CSF: Fluído Cerebroespinal

DHEA: Desidroepiandrosterona

DHEAS: Sulfato de Desidroepiandrosterona

DHPROG: Di-hidroprogesterona

GABA: Ácido Gama- Aminobutírico

GnRH: Hormona Libertadora de Gonadotrofina

GPCR: Recetor Canabinóide Associado à Proteína G

HPA: Eixo Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal

KCC2: Transportador iónico potássio-cloro do tipo 2

logP : Coeficiente de Partição

MAP: *Mitogen Activated Protein*

mPR : Recetores Membranares Específicos

NCI: Ionização Química Negativa

NMDA: N - metil - D - Aspartato

PREG: Pregnenolona

PREG-S: Sulfato de Pregnenolona

PVN: Núcleo Paraventricular

PGRMCI: Recetores Membranares da Progesterona no Componente I

PR: Recetores Intracelulares

RIA: Radioimunoensaios

StAR: Proteína Reguladora Esteroidogénica

SSRIs: Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina

THC: delta - 9 tetrahydrocannabinol

THDOC: Alotetrahidroxicorticosterona

TMI: Região Transmembranar I

TM4: Região Transmembranar 4

TSPO: Proteína de Translocação

VDAC: Canal Aniônico Dependente de Voltagem

3 α ,5 α -THPROG: Tetra-hidroprogesterona ou Alopregnanolona

3 β ,5 α - THPROG: Epi-alopregnanolona

Índice

1. Resumo	viii
2. Abstract	ix
3. Introdução.....	1
4. Neurosteróides.....	3
4.1 Caraterização dos Neuroesteroides.....	3
4.2. Biossíntese de Neuroesteroides	4
4.3. Conceitos de Neuroesteroides.....	6
4.4. Neuroesteroides e Recetores GABA.....	8
4.5. Importância da Pregnenolona	11
5. Potenciais Ações Terapêuticas dos Neuroesteroides	13
6. Conclusão.....	17
7. Referências Bibliográficas.....	19

I. Resumo

Esteróides neuroativos que são sintetizados no cérebro e no sistema nervoso a partir do colesterol são conhecidos como “Neuroesteroides”. Estas moléculas e os seus derivados sintéticos influenciam a função de múltiplos mecanismos de sinalização incluindo os recetores do ácido gama-aminobutírico e do glutamato, o maior neurotransmissor inibitório e excitatório respetivamente no sistema nervoso central.

Estes esteroides exercem funções muito importantes, pois contribuem na mielinização e na organização da conectividade cerebral. Sob situações de *stress*, as concentrações dos neuroesteroides, tal como da alopregnanolona e alotetrahidroxicorticosterona, estão alteradas. Perante esta situação tem sido sugerido que a desregulação da síntese dos neuroesteroides tem influência nas doenças psiquiátricas relacionadas com o *stress*, incluindo alterações de humor e ansiedade.

Os transtornos depressivos são frequentes e representam uma carga importante para a sociedade contemporânea. Estas alterações psicológicas representam a maior causa de deficiência nas sociedades ocidentais, e compreendem cerca de 40 % das doenças que resultam na incapacidade de trabalhar de forma produtiva.

Ao longo do trabalho, irei abordar o papel do ácido gama-aminobutírico e dos neuroesteroides no *stress* e na depressão e eventuais estratégias na manipulação da sua síntese no Sistema Nervoso Central e os potenciais fins terapêuticos.

Palavras- chave: Neuroesteroides, *stress*

2. Abstract

The neuroactive steroids which are synthesized in the brain and nervous system from cholesterol are known as “Neurosteroids”. These agents and their synthetic derivatives influence the function of multiple signaling pathways including receptors for γ -aminobutyric acid and glutamate, the major inhibitory and excitatory neurotransmitters in the central nervous system.

These steroids have crucial functions such as contributing to the myelination and organization of the brain connectivity. Under the stressful circumstances, the concentrations of neurosteroid products such as allopregnanolone and allotetrahydrodeoxycorticosterone alter. It has been suggested that dysregulation of neurosteroid production plays a role in the pathophysiology of stress and stress-related psychiatric disorders, including mood and anxiety disorders.

Depressive disorders are frequent, representing an important burden for contemporary society. These mental disorders are among the leading causes of disability in western societies, and comprise approximately 40% of illnesses that result in an inability to work productively.

Then, I will review evidence indicating a role for γ -aminobutyric acid and neurosteroids in stress and depression, and focus on potential strategies that can be used to manipulate central nervous system neurosteroid synthesis and function for therapeutic purposes.

Keywords: Neurosteroids, *stress*

3. Introdução

Neuroesteroides, também conhecidos como esteroides neuroativos, são esteroides sintetizados no cérebro e no Sistema Nervoso (1). Estes são moduladores endógenos e exógenos (2), visto que atuam em várias funções cerebrais cruciais à manutenção da homeostase (1), cooperam em múltiplos mecanismos de sinalização, tais como nos recetores do GABA, (ácido gama-aminobutírico) e do Glutamato, conhecidos respetivamente como os maiores neurotransmissores inibitórios e excitatórios do Sistema Nervoso Central, (SNC) (2), assim como no processo de mielinização, contribuindo desta forma na organização da conectividade cerebral. (1)

As funções cerebrais têm sido muito estudadas atualmente, dando ênfase aos neuroesteroides, pois estes têm um papel muito ativo quer nas ligações a recetores intracelulares específicos, quer pela sua alta afinidade a recetores membranares, GABA-A ou recetores NMDA (N-metil-D-Aspartato), (3).

Estes estudos, mostram que há cada vez mais a evidência de que a produção de neuroesteroides está relacionada com alguns transtornos psiquiátricos, tais como alterações no humor e ansiedade, (2), visto que em situações de *stress* se tem verificado que as concentrações de neuroesteroides, como por exemplo da alopregnanolona, (alloP), um dos principais neuroesteroides está alterada, (1).

A diminuída síntese de neuroesteroides, contribui possivelmente para o desenvolvimento da ansiedade e para transtornos depressivos, pois a alterações nos níveis de alloP na circulação e no fluído cérebroespinal, (CSF), associam-se depressões major, distúrbios de ansiedade, alterações disfóricas pré-menstruais, sintomas de esquizofrenia e comportamentos agressivos, (8). De acordo com estes dados, destaca-se a importância de alloP e de outros neuroesteroides, como a pregnenolona, (PREG), na regulação das emoções e no seu conseqüente uso terapêutico na depressão e ansiedade principalmente, não só por mecanismos GABAérgicos, mas também pelos seus efeitos na neurogênese, na mielinização, na neuroprotecção e nas funções de regulação do eixo Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal (HPA). (4)

Neste contexto, os neuroesteroides podem servir como biomarcadores no diagnóstico de várias doenças e também como potenciais alvos terapêuticos, (3).

Os distúrbios psíquicos representam um grupo de patologias mais comuns, visto que no mínimo 30% dos adultos sofrem uma destas perturbações em algum momento da sua vida. Este tipo de transtornos são os que contribuem mais significativamente para a mortalidade,

fazendo também parte dos fatores de risco associados a doenças cardiovasculares, diabetes e síndrome metabólico, patologias estas as mais comuns dos últimos séculos e com a maior taxa de morbidade e mortalidade associada. (2)

4. Neurosteróides

4.1. Caraterização dos Neuroesteroides

Neuroesteroides, são uma classe de esteroides endógenos sintetizados no cérebro e no sistema nervoso central e periférico a partir do colesterol, (1,3). É baseado na sua síntese que estes estão classificados como percursores, tais como PREG, desidroepiandrosterona (DHEA), progesterona, (PROG) e androstenediona e como metabolitos a alloP. (1)

Por outro lado, estes também podem ser classificados de acordo com a sua estrutura, dividindo-se em três subtipos:

- Neuroesteroides Pregnano, como a alloP e alotetrahidroxicorticosterona (THDOC);
- Neuroesteroides Androstano, como o androstanediol e eticolanolona;
- Neuroesteroides Sulfatados, como o sulfato de pregnenolona (PREG-S) e sulfato de desidroepiandrosterona (DHEA-S). (1)

Os neuroesteroides como referido anteriormente contribuem na mielinização e na organização da conectividade cerebral, contudo a sua estrutura está diretamente relacionada com a sua atividade, que por sua vez influencia a interação destes com alguns complexos de recetores na medula espinhal e no cérebro, tais como o recetor GABA, uma interação de rápidos efeitos de ação que conduz à excitabilidade neuronal. (1 e 5)

Glutamato e GABA, são os principais neurotransmissores excitatório e inibitório respetivamente do SNC. A alteração destes sistemas de transmissão envolvidos na excitação, cognição, emoção e motivação pelos neuroesteroides, faz com que estes tenham a capacidade de participar na terapêutica de múltiplas doenças relacionadas com o foro neuropsiquiátrico. (2) Além disso, certos estudos comprovam que a produção de neuroesteroides no cérebro está alterada em situações de stress e em algumas alterações psicológicas, incluindo a depressão. (2) Por este motivo, este tipo de esteroides pode mediar mecanismos fundamentais subjacentes a algumas destas alterações psíquicas, apresentando-se como potenciais alvos clínicos, nas alterações de humor, ansiedade, esquizofrenia, alterações do sono, dor crónica, epilepsia, doenças neurodegenerativas, entre outras. Na maioria destas doenças os neuroesteroides atuam por ação direta no cérebro, mas no caso da dor crónica eles atuam tanto no cérebro como na medula espinhal. (2)

Os principais alvos de ação dos neuroesteroides são os recetores e os sistemas de transmissão GABA e Glutamato, mas além destes, esta classe de esteroides tem a capacidade de alterar outros recetores e canais iónicos, incluindo recetores de acetilcolina nicotínicos,

recetores de glicina, recetores sigma, canais de cálcio dependentes de voltagem e canais de potássio dependentes de voltagem. (2)

4.2. Biossíntese de Neuroesteroides

Os esteroides derivam de um precursor metabólico armazenado principalmente nas membranas plasmáticas e em “jangadas lipídicas” nas células esteroidogénicas, o colesterol.

As hormonas esteroides são sintetizadas por processos agudos, pois trata-se de uma reação dependente da circulação de hormonas peptídicas, tais como a hormona adrenocorticotrófica, (ACTH), hormona luteinizante ou gonadotrofina coriónica. Estas hormonas ligam-se a recetores acoplados à superfície de células esteroidogénicas, (hormona ACTH às células adrenais e hormona luteinizante e gonadotrofina coriónica às gónadas), levando à ativação de cascatas de sinalização intracelular e assim ao fluxo do colesterol na membrana mitocondrial, que é posteriormente convertido em PREG na matriz mitocondrial, por ação enzimática. (6)

O cérebro contém todas as enzimas necessárias à biossíntese de esteroides, tornando-se capaz de os sintetizar, estes são conhecidos como neuroesteroides. A sua síntese ocorre no sistema nervoso central e periférico, nas células da glia e também em alguns neurónios em muitas regiões do cérebro a partir do colesterol ou de esteroides precursores provenientes de fontes periféricas. (3)

A biossíntese de neuroesteroides é um processo comum em todos os tecidos esteroidogénicos, baseia-se na mobilização do colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna e a sua subsequente clivagem por uma enzima mitocondrial a CYP11A1, (enzima da cadeia de clivagem da CYP450), dando origem à PREG. A conversão do colesterol em PREG é o passo limitante na síntese dos neuroesteroides e de todas as hormonas esteroides. (3)

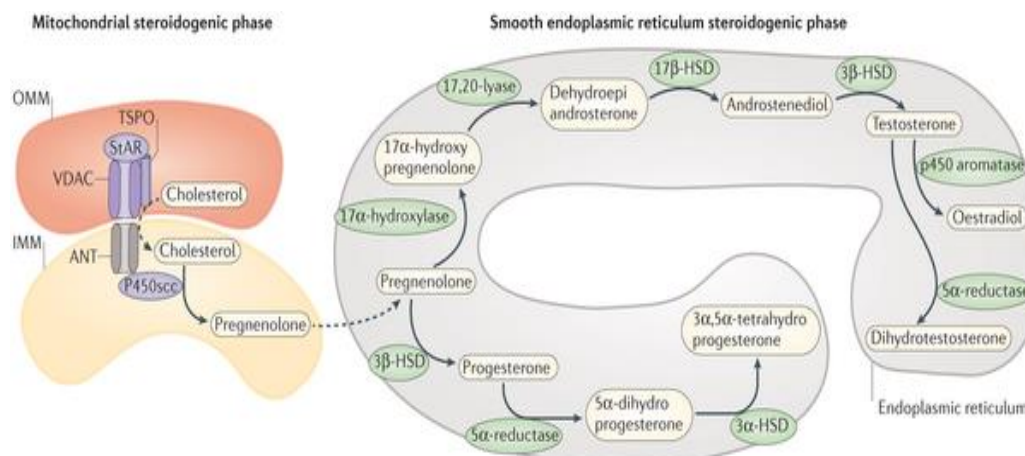


Figura 1: Biossíntese de neuroesteroides. (Adaptado de “Nature Reviews”, Neuroscience)

O colesterol é uma molécula hidrofóbica e por isso tem dificuldade em movimentar-se em meios aquosos, necessitando da cooperação de proteínas intracelulares para se movimentar, visto que a mitocôndria é um organelo de membrana dupla, o transporte do colesterol da membrana externa para a membrana interna realiza-se em meio aquoso, tornando-se necessária a existência de múltiplos componentes proteicos membranares, para tal existe um complexo proteico conhecido como Transduceossoma.

Transduceossoma é um conjunto de proteínas citoplasmáticas e mitocondriais que recebem sinais hormonais e auxiliam na transferência membranar do colesterol. (6) É constituído por uma proteína reguladora esteroidogénica, (StAR) e pela proteína de translocação, (TSPO), formalmente conhecida por recetor benzodiazepínico periférico. (2)

TSPO é um complexo multiproteico que inclui um canal aniónico dependente de voltagem, (VDAC) e um transportador adenina nucleotídico, (ANT), (2). É também a proteína chave na biossíntese dos neuroesteroides, visto que a sua ativação por sinais ou ligantes endógenos, conduz ao aumento da produção de neuroesteroides, devido ao aumento da transferência do colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna onde está localizada a enzima CYP11A1. (7)

TSPO e VDAC são proteínas existentes na membrana mitocondrial externa, têm particular interesse, visto que o complexo TSPO-VDAC é o sítio de ligação das benzodiazepinas e deste modo a pesquisa de novos fármacos para este alvo é importante, pois a ativação deste complexo leva ao aumento da produção de neuroesteroides. (6)

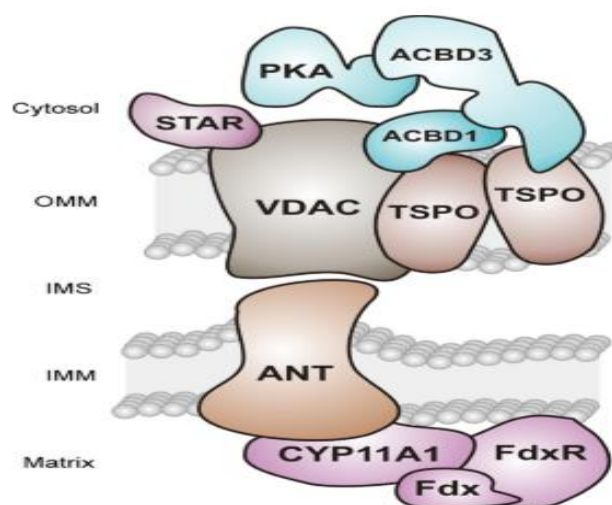


Figura 2: Transduceossoma na membrana mitocondrial (Adaptado da REF 11)

Os mecanismos de regulação da esteroidogénese, afetam principalmente o transporte do colesterol desencadeado pela StAR e por isso qualquer alteração nesta proteína leva a uma alteração na síntese de neuroesteroides.

As respostas esteroidogénicas agudas são mediadas principalmente pela disponibilidade de substrato e portanto envolvem a StAR, pois esta é uma proteína sintetizada em resposta à estimulação da célula para produzir esteroides, enquanto que a produção regular de esteroides é quantitativamente determinada pela expressão da CYP11A1 e qualitativamente pela expressão de enzimas a jusante. (6)

4.3. Conceitos de Neuroesteroides

PREG, metabolito do colesterol é submetido a vários processos metabólicos, processos estes que dependem de vários fatores, incluindo o tipo de tecidos esteroidogénicos, tipo de espécies e de enzimas. Por exemplo, os processos metabólicos dos esteroides nas glândulas endócrinas nos humanos e nos animais são diferentes, visto que nos roedores, o PREG é convertido principalmente no seu derivado sulfatado (PREG-S) e em PROG, enquanto que nos humanos PREG além destes também é convertido em 17-hidroxi-pregnenolona, (17-OH PREG). (3)

A sulfatação e a hidrólise de conjugados sulfatados, são reações muito importantes no metabolismo de PREG e são catalisadas respetivamente pela sulfotransferase e pela sulfatase. A sulfatação é geralmente um processo de desativação, contudo um conjugado sulfatado pode ser bastante reativo, temos o exemplo de PREG-S, esta é a forma metabólica que permite a sua eliminação, no entanto dentro do cérebro é um esteroide ativo, tendo elevada afinidade de ligação ao recetor GABA e NMDA. (3)

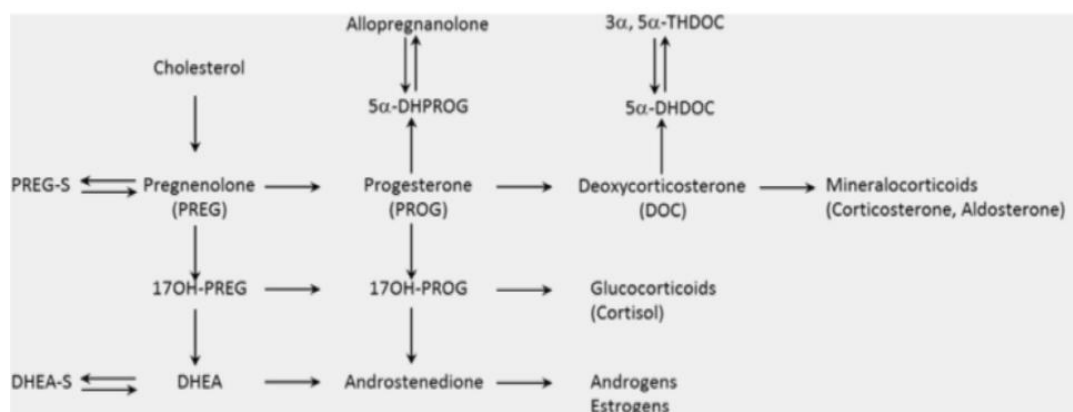


Figura 3: Síntese e principais metabolitos da Pregnenolona. (Adaptado de REF 3)

PROG outro neuroesteróide muito importante, pode ser metabolizada no tecido endócrino em di-hidroprogesterona (DHPROG), tetra-hidroprogesterona ($3\alpha,5\alpha$ -THPROG ou alloP) ou no seu isómero $3\beta,5\alpha$ -THPROG (epi-alopregnanolona), em deoxicorticosterona e em corticosterona nos roedores e em 17-OH PREG, aldosterona e cortisol nos humanos. (3)

O metabolito 17-OH PREG proveniente de PROG é convertido em DHEA, que posteriormente pode sofrer uma sulfatação, ficando DHEA-S, o maior esteroide presente na circulação dos humanos, podendo ser também convertido em androgénios e estrogénios. (3)

DHEA tem um papel importante no alívio do *stress* e no aumento da resiliência em seres humanos. Vários ensaios clínicos sob condições de placebo têm demonstrado efeitos benéficos da terapia com DHEA, em alterações de humor nas doenças depressivas, função sexual e no bem-estar. DHEA atua diretamente como um neuroesteroide e como precursor indireto de várias hormonas neuroesteroides, como exemplo desta última, numa investigação com ruminantes verificou-se que o tratamento com DHEA aumenta os níveis de alloP tanto no plasma como no hipocampo e no hipotálamo. (8)

Tanto nos animais como nos humanos, os neuroesteroides têm demonstrado ação psicotrópica e estão implicados tanto na patogénese da depressão como na ação antidepressiva. (8)

AlloP e PREG são metabolitos da progesterona e androsterona, que por sua vez são também metabolitos da DHEA e da di-hidrotestosterona, estes são potentes moduladores do recetor GABA-A, pois tanto a alloP como a PREG reforçam a transmissão GABAérgica e diminuem a transmissão NMDA. (5)

Estudos que relatam anormalidades nos níveis plasmáticos dos neuroesteroides em homens e mulheres deprimidas e níveis normais no plasma e no CSF de doentes sujeitos a tratamentos com antidepressivos, (8) referem que esta situação se deve ao facto de existirem diferentes perfis farmacológicos em vários esteroides. (5)

De modo a entender as diferenças farmacológicas, ou seja, a ação dos esteroides nos recetores e nos seus alvos membranares, compararam-se as características estruturais com a sua atividade nos alvos moleculares, através da análise das concentrações dos neuroesteroides no cérebro. (5)

Os métodos de análise mais utilizados envolvem os radioimunoensaios (RIA), estes não analisam apenas a concentração absoluta do esteroide de interesse e por isso não são suficientemente específicos para garantir a ausência de imunorreatividade cruzada entre os

diferentes esteroides com estruturas químicas semelhantes. Devido à diminuída sensibilidade deste método, outros métodos foram desenvolvidos, como a análise de espectrofotometria de massa, que por sua vez apresenta elevada sensibilidade e especificidade, pois permite a análise simultânea de vários esteroides neuroativos. (5)

Como os neuroesteroides apresentam concentrações muito baixas no cérebro, desenvolveram-se métodos mais sensíveis para estas concentrações, tais como a ionização química negativa, (NCI). Este método baseia-se na derivatização do analito de interesse que possui um grupo com elevada afinidade a eletrões. O composto a analisar é então derivatizado por captura de eletrões de modo a originar um ião-negativo na fonte de iões. A grande vantagem deste método é que a ionização é específica para compostos que capturam eletrões, dando assim uma excelente sensibilidade ao método. (5)

Esta análise permitiu verificar que os esteroides sulfatados, PREG-S e os seus isómeros, (3 α 5 β S e 3 β 5 β S) são moduladores positivos e negativos dos recetores NMDA respetivamente, alterando a atividade do recetor ionotrópico em sítios de ligação diferentes. (5)

4.4. Neuroesteroides e Recetores GABA

O sistema de neurotransmissão GABA é o maior alvo dos neuroesteroides. (2) Os neuroesteroides alteram rapidamente a excitabilidade neuronal através da interação direta com estes recetores. (7)

Os recetores GABA-A são responsáveis pela maioria das transmissões inibitórias no cérebro, (11) e são constituídos por canais iónicos ativado por ligantes. (20) A ativação do recetor GABA-A por vários ligantes leva ao influxo do ião cloreto (Cl⁻) e à hiperpolarização membranar, provocando uma diminuição na excitabilidade. AlloP, THDOC e outros neuroesteroides estruturalmente relacionados atuam como moduladores alostéricos positivos ativando diretamente os recetores GABA-A. (9)

Estruturalmente estes recetores, são canais pentaméricos compostos por várias subunidades, (α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ , ϵ , θ , ρ 1-3). (2) De acordo com a sua localização, os recetores GABA-A são caracterizados como recetores sinápticos e extra-sinápticos. Esta localização depende das subunidades que os constituem. Os recetores sinápticos, alvo de sinapses contêm a subunidade γ e estão presentes ubiquamente dentro do cérebro, enquanto que os que recetores extra-sinápticos expressam a subunidade δ . (2)

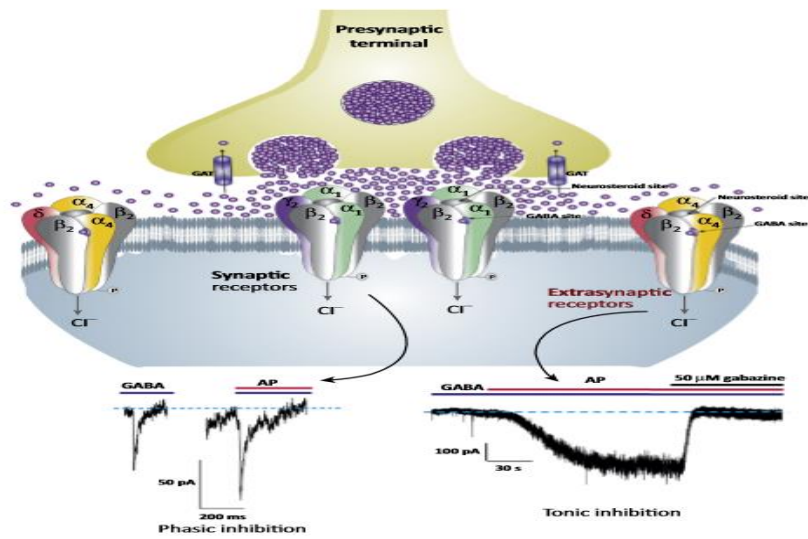


Figura 4: Mecanismo dos neuroesteroides nos recetores GABA-A sinápticos e extra-sinápticos. (Adaptado de REF 7)

Os neuroesteroides atuam principalmente em dois sítios de ligação, um sítio de ligação alostérico no domínio transmembranar da subunidade α e um local de ativação direta na interface da subunidade β , podendo também exercer a sua função por difusão membranar. (7,9)

A ação dos neuroesteroides depende das suas concentrações, visto que a elevadas concentrações estes ativam diretamente os recetores, uma característica única dos neuroesteroides, enquanto que a baixas concentrações ativam alostericamente os recetores GABA-A. A administração exógena de neuroesteroides pode atingir elevadas concentrações dentro do cérebro capazes de ativar diretamente os recetores. A baixas concentrações, (níveis nanomolares), eles atuam como agonistas alostéricos, atingindo a eficácia máxima aquando a saturação dos sítios de ligação alostéricos. A elevadas concentrações, (níveis micromolares), que excedem os níveis de saturação dos sítios alostéricos, os neuroesteroides atuam como agonistas diretos, aumentando a entrada de ião cloreto nos neurónios. (7)

Os neuroesteroides ativam os recetores GABA-A em sítios específicos através da sua ligação a subunidades específicas. Este tipo de interações faz com que os esteroides potenciadores do GABA possuam especificidade estrutural. Uma ligação dadora de hidrogénio na posição 3α , uma ligação aceitadora de hidrogénio na posição 17β e um sistema de anéis pregnano reduzidos, aumentam a atividade dos neuroesteroides nestes recetores, assim como os esteroides que tenham tanto configurações 5α ou 5β têm efeitos sedativos.

Os aminoácidos dos recetores GABA-A presentes nas regiões transmembranares 1 e 4 (TM1 e TM4) da subunidade $\alpha 1$ TM1 e subunidade $\beta 2$ TM2 são importantes para a abertura ou fecho diretos dos canais e influenciam a ligação dos neuroesteroides ao recetor. (2)

Os esteroides são moléculas altamente lipofílicas e afetam a fluidez membranar, desta forma a existência de enantiômeros, (enantiômeros, são definidos como um par de isômeros óticos, são imagem no espelho um do outro e não são sobreponíveis), influencia a ação destes nos recetores GABA-A, pois várias configurações lipídicas dos esteroides têm efeitos idênticos.

Contudo, a solubilidade lipídica influencia a potencia e a efetividade dos esteroides neuroativos nos recetores GABA-A. Esta teoria foi analisada em estudos que usaram análogos de esteroides com várias lipossolubilidades, ($\log P$), onde se verificou que a potência e provavelmente a eficácia dos esteroides aumentou com o aumento do $\log P$ até um certo limite, ou seja, quanto mais lipossolúveis mais potentes são os esteroides. (2)

A regulação da atividade do eixo HPA pelo *stress* é um mecanismo fundamental de sobrevivência e a sua alteração conduz a alterações psíquicas.

O eixo HPA medeia respostas fisiológicas em situações de *stress*, estas respostas incluem o fator de libertação da corticotrofina (CRF), um peptídeo neurotransmissor que é libertado dos neurónios no núcleo paraventricular, (PVN) do hipotálamo e induz a secreção da hormona ACTH da glândula pituitária. Posteriormente, ACTH leva à libertação de cortisol nos humanos, corticosterona nos animais e adrenalina das glândulas adrenais. (1)

Ao contrário do glutamato, um neurotransmissor excitatório que ativa o eixo HPA, a secreção de CRF a partir dos neurónios do PVN pode ser inativada pelos neurónios GABAérgicos. Estudos mostram que alloP pode atuar no aumento da ação do GABA nos neurónios do PVN ou na entrada de CRF nos neurónios de modo a atenuar as respostas ao *stress* pelo eixo HPA. A atividade de alloP nos recetores GABA-A depende das suas concentrações, baixas concentrações de alloP leva à ativação dos recetores GABA-A, enquanto que a elevadas concentrações este não tem atividade significativa. Além do alloP, também o THDOC modula a resposta fisiológica ao *stress* através dos recetores GABA-A que contêm a subunidade δ , este ativa o eixo HPA por desfosforilação do resíduo de Ser940, (aminoácido presente no canal iónico que constitui os recetores GABA-A, responsável pelo transporte do ião cloreto), no PVN do hipotálamo, resultando num colapso do gradiente de cloreto e na transmissão GABAérgica excitatória. (1)

A atividade do GABA depende do gradiente do ião cloreto, diretamente relacionado com o co-transporte de K^+/Cl^- pelo transportador iónico potássio-cloro do tipo 2, (KCC2). A fosforilação do transportador KCC2 no resíduo de Ser940 leva à ativação de KCC2, por outro lado a desfosforilação inativa o KCC2, resultando em ações excitatórias do GABA. (11)

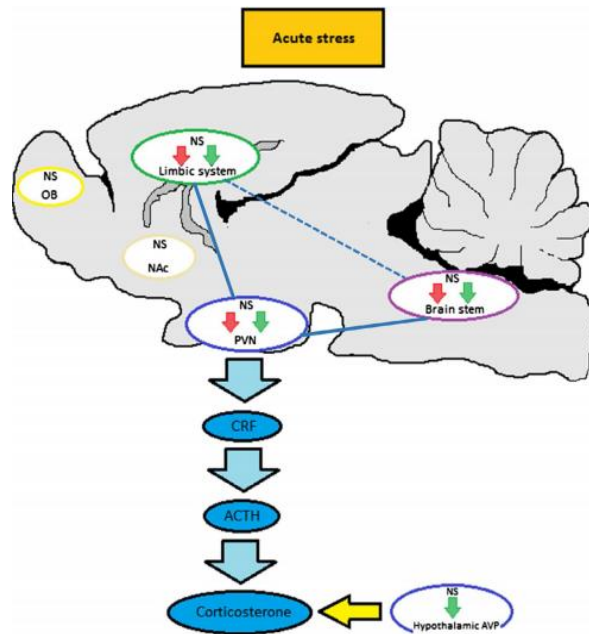


Figura 5: Potencial papel da neuroesteroidogênese na regulação do eixo HPA. (Adaptado da REF 1)

4.5. Importância da Pregnenolona

PREG é o principal esteroide sintetizado a partir do colesterol nos mamíferos e invertebrados. Os principais locais da sua síntese são as gónadas, as glândulas adrenais e o cérebro, sendo posteriormente submetida a vários mecanismos de metabolização que são dependentes de vários fatores, incluindo espécies, tecidos esteroidogénicos e enzimas esteroidogénicas. PREG é conhecida como precursor de outros esteroides e não é capaz de atuar sozinha. Os seus alvos moleculares incluem principalmente recetores Sigma 1, microtúbulos citoplasmáticos e o recetor canabinóide do tipo 1 (CB1). (3)

Recetor Sigma 1 é uma proteína atípica, inicialmente identificada como recetor opióide, depois como sítio de ligação à fenilciclidine associado ao recetor NMDA e finalmente como um recetor de ligação membranar distinto dos outros recetores. Este recetor está associado a funções como aprendizagem e memória, *stress*-ansiedade e transtornos depressivos. PROG e PREG-S atuam como antagonistas e agonistas destes recetores respetivamente. (3)

Microtúbulos são um alvo intracelular do PREG que se encontra associado a uma proteína, MAP (*Mitogen Activated Protein*). MAP's estão envolvidas nas configurações neuronais e no controlo da relação entre a plasticidade e a rigidez dos processos neuronais. PREG liga-se especificamente e com elevada afinidade ao microtúbulo associado a uma proteína 2 (MAP2), atuando como agonista desta. MAP2 faz parte da família de proteínas que são expressas principalmente no corpo celular neuronal, nas dendrites, onde é realizada a montagem e a estabilização dos microtúbulos. A interação de PREG com os microtúbulos

provoca um aumento do desenvolvimento cerebral, uma alteração na plasticidade de processos neuronais, que influenciam o envelhecimento e sintomas depressivos, uma vez que a expressão de MAP2 no hipocampo está envolvida na farmacologia depressiva. (3)

Relativamente ao recetor CBI, este é expresso no cérebro sendo o alvo principal do maior componente psicoativo a *Cannabis sativa*, delta-9 tetrahidrocanbiol (THC), este encontra-se normalmente acoplado à proteína G, (GPCR). (3)

Estudos indicam que PREG é capaz de reduzir a atividade canabinóide induzida pelo recetor CBI. De facto verificou-se que PREG foi capaz de atuar neste recetor como modulador endógeno alostérico negativo, reduzindo a atividade de vias intracelulares, incluindo especificamente a proteína MAP-quinase, uma proteína responsável por regular várias atividades celulares incluindo a expressão génica, a mitose e a apoptose celular, não interferindo diretamente com a ligação dos ligantes ao recetor CBI. A modulação do recetor acoplado à proteína G, pela PREG como um ligando alostérico apresenta uma nova oportunidade para o desenvolvimento de novos fármacos destinados à toxicidade e dependência canabinóide, pois acredita-se que os moduladores alostéricos são mais vantajosos para o desenvolvimento de fármacos comparando com os ligantes ortostéricos, moléculas que se ligam ao mesmo sítio dos ligantes endógenos modificando a atividade intrínseca do recetor, como os ligantes alostéricos não modificam diretamente a atividade dos recetores, estes apresentam menos efeitos secundários que os compostos ortostéricos. Desta forma, a descoberta de alvos endógenos específicos da PREG, propõem que a sua ação biológica endógena seja utilizada para efeitos farmacológicos. (3)

5. Potenciais Ações Terapêuticas dos Neuroesteroides

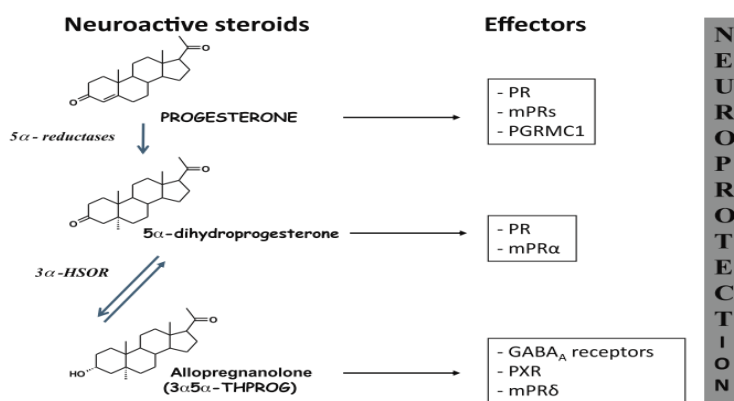


Figura 6: Diferentes mecanismos de ação da progesterona e alopregnanolona como agentes pleiotrópicos. (Adaptado de REF 4)

PROG e alloP são agentes neuroprotetores pleiotrópicos, ou seja têm diferentes mecanismos de ação. PROG atua por mecanismos genómicos após ligação a recetores intracelulares, (PR), através da sua rápida ação por interação com recetores específicos membranares, (mPR) ou por ligação aos recetores membranares da PROG no componente I, (PGRMC1). (4)

A PROG é convertida em 5 α -di-didroprogesterona, que se liga tanto aos recetores intracelulares (PR), como aos recetores membranares com a subunidade α . 5 α -di-didroprogesterona é depois convertida a alloP através da enzima 3 α -hidroxiesteróide redutase, (3 α -HSD). Devido ao grupo hidroxilo no carbono 3 da alloP, esta não tem afinidade para os recetores intracelulares, mas é um potente modulador alostérico dos recetores GABA-A. Os efeitos neuroprotetores da alloP podem ser mediados pelo recetor pregnano X (PXR) ou pelo recetor da progesterona membranar com a subunidade δ , (mPR δ). (4)

A descoberta de moléculas terapêuticas eficazes na neuroproteção e na neuroregeneração depende principalmente da identificação correta dos alvos farmacológicos e dos mecanismos de sinalização subjacentes. (4)

Nos últimos anos, verificou-se que talvez a diminuição da síntese de neuroesteroides está relacionada com o desenvolvimento de transtornos depressivos e de alterações na ansiedade, isto porque se observou em alguns estudos que a redução de esteroides neuroativos, no sêrum/plasma e no fluído cérebroespinal, em particular os agonistas dos recetores GABA-A, a PROG e o seu metabolito, alloP estão relacionados com alterações afetivas incluindo depressão major, alterações de ansiedade, alterações disfóricas pré-

mentruais, depressão pós-parto, impulsos agressivos e esquizofrenia. Desta forma, coloca-se a hipótese de que uma deficiência na regulação de alloP e de outros neuroesteroides GABAérgicos no cérebro são um fator de risco para as alterações do foro psicológico mencionadas anteriormente. Esta hipótese conduz à descoberta de novos alvos terapêuticos capazes de tratar em particular a ansiedade e transtornos depressivos. (4)

O tratamento destes transtornos psíquicos baseia-se na descoberta de moléculas capazes de aumentar a neuroesteroidogénese, em particular a alloP, devido às suas propriedades antidepressivas e ansiolíticas. A alloP não exerce apenas os seus efeitos por mecanismos GABAérgicos, mas também por aumentar a neurogénese, mielinização e por regular a função do eixo HPA. (12)

Relativamente à neuroesteroidogénese, recentemente o TSPO, foi identificado como um potencial alvo, visto que este é o elemento chave no transporte mitocondrial do colesterol, na mobilização deste da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna, sendo responsável por fornecer o colesterol à primeira enzima esteroidogénica, CYP11A1, responsável pela clivagem deste e por transformá-lo em PREG o precursor de todos os neuroesteroides. (13)

Os ligantes do TSPO, como por exemplo o XBD 173 ou o *etifoxine*, aumentam a neuroesteroidogénese sem causar os efeitos adversos que são muito comuns nos tratamentos convencionais com benzodiazepinas, como a sedação ou habituação. (13)

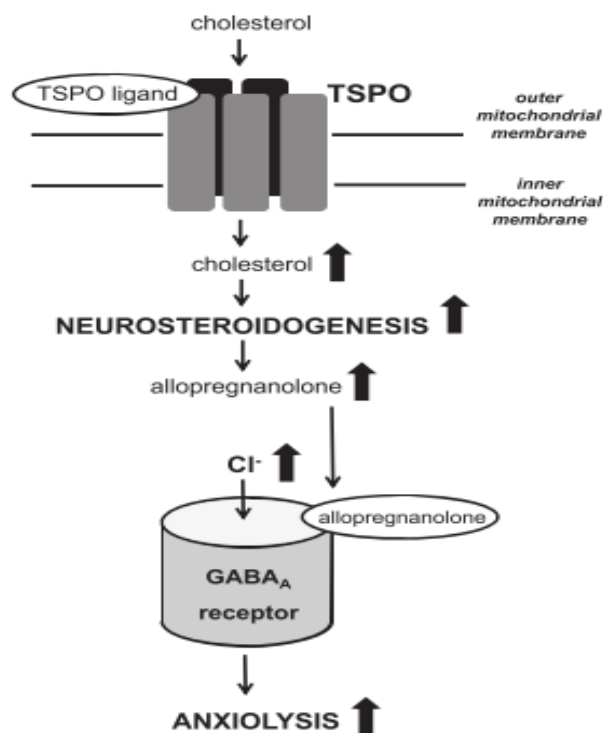


Figura 7: O papel do TSPO na ansiedade. (Adaptado de REF 13)

Durante o desenvolvimento de novas moléculas é necessário ter em conta vários fatores, tais como os efeitos adversos e a biodisponibilidade do composto após a sua administração. Por outro lado o conhecimento das propriedades dos fármacos e dos seus metabolitos, a absorção, distribuição, metabolismo e excreção, (ADME) devem ser avaliadas de modo a perceber as diferenças de atuação entre espécies e otimizar a dose administrada. (3)

A absorção e a biodisponibilidade adequada de um fármaco deve ser alcançada para que este exerça o efeito desejado no organismo. Define-se absorção pela quantidade de fármaco total que atravessa o epitélio gastrointestinal no caso de uma administração por via oral e a biodisponibilidade a quantidade biológica que atinge a circulação sistémica. (3)

Considerando a terapia com neuroesteroides naturais, esta está limitada devido a obstáculos farmacocinéticos destes, como por exemplo a sua baixa biodisponibilidade e o seu tempo de semi-vida curto devido ao seu rápido metabolismo *in vivo*. (3)

Os esteroides naturais tais como a alloP têm baixa biodisponibilidade devido à sua rápida inativação por glucoronidação e conjugação do sulfato, e pela oxidação do grupo hidroxilo no carbono 3. (13) Perante esta situação, a síntese de neuroesteroides pode apresentar uma alternativa à terapêutica. (7)

Os neuroesteroides sintéticos em estudo com potenciais propriedades terapêuticas são o *ganaxolone*, o *alfaxolone*, o *minaxolone* e o *alfadolone*. O *alfaxolone* tem sido avaliado no uso veterinário e o *ganaxolone* investigado em ensaios clínicos para a epilepsia. O desenvolvimento do *minaxolone* foi interrompido devido à carência de características aceitáveis para a sua utilização. (7)

Também o conhecimento da relação estrutura química/ atividade biológica do esteroide permite identificar posições do carbono específicas possíveis de serem alteradas na estrutura dos esteroides, possibilitando a síntese de análogos de esteroides com a atividade terapêutica pretendida. Desta forma, estudos que compararam estrutura/atividade verificaram que o grupo hidroxilo no carbono 3 (3 α -hidroxilo) é necessário para que o esteroide se consiga ligar e por conseguinte para exercer a sua atividade. Além disso, enzimas envolvidas na síntese e no metabolismo dos esteroides têm como alvo o carbono na posição 3 da progesterona e os seus grupos hidroxilos e o carbono na posição 17 dos androgénios e estrogénios. Assim, o desenvolvimento de novas moléculas é baseado na produção de análogos do C3 da PREG como por exemplo o 3-metoxi pregnenolona e análogos do C3-C17. A patente proposta para o uso do análogo 3-metoxi pregnenolona da PREG refere-se ao seu uso no tratamento de alterações depressivas e doenças neurológicas de longo termo. O uso

dos análogos C3-C17 tem sido investigado nos recetores CBI relacionados com o abuso de canábis como principal objetivo terapêutico e outras aplicações terapêuticas, incluindo alterações metabólicas, atraso mental e doenças de pele. (3)

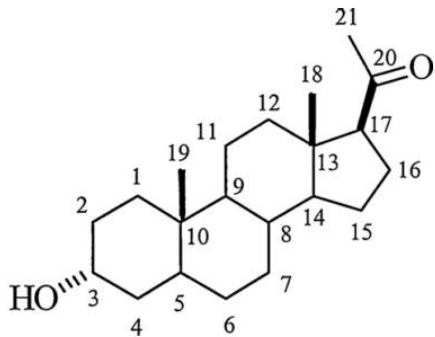


Figura 8: Estrutura do 3 α – hidroxipregnano.
(Adaptado de REF 2)

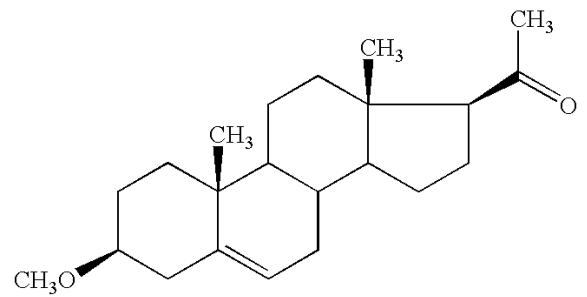


Figura 9: Estrutura 3 β -metoxi pregnenolona.
(Adaptado de REF 20)

6. Conclusão

Ao longo deste trabalho, conclui que os neuroesteroides têm características específicas incluindo a sua rápida capacidade de ação.

Os neuroesteroides são sintetizados “dentro do cérebro para o cérebro” e atuam nos recetores nas membranas celulares, que posteriormente ativam várias cascatas de sinalização resultando em rápidos efeitos autócrinos e parácrinos, independentemente dos seus efeitos genómicos. Neste contexto muitos alvos dos neuroesteroides incluem os recetores de aminoácidos inibitórios e excitatórios, recetores GABA-A e recetores NMDA respetivamente. A ativação ou inibição destes recetores pelos neuroesteroides é dependente da estrutura química dos esteroides e da subunidade que compõe o recetor, sendo esta última determinante na modulação do recetor pelo neuroesteroide. Por exemplo, ao longo deste trabalho verificámos que o C3 α do PROG e da alloP atua como inibidor esteroide, enquanto que as formas sulfatadas do PREG e DHEA atuam como esteroides excitatórios, inibindo e aumentando as correntes mediadas pelos recetores GABA-A e NMDA respetivamente em culturas neuronais localizadas no hipocampo. (1)

Relativamente a outros mecanismos de ação dos neuroesteroides, as propriedades ansiolíticas da PROG e alloP, fazem-se sentir através do restabelecimento dos níveis dos neuroesteroides pela utilização de análogos sintéticos de alloP, visto que a diminuída concentração de alloP no sistema nervoso, é responsável pela ocorrência de ataques de pânico espontâneos. O restabelecimento das concentrações de neuroesteroides tanto pode ser pela estimulação endógena dos neuroesteroides através da utilização de inibidores seletivos da recaptação da serotonina, (SSRIs), visto que a sua função é promover a atividade de enzimas envolvidas na formação dos neuroesteroides, como por exemplo da enzima 3 α -HSD, como pela utilização de ligantes ao TSPO, tais como a XBD 173, favorecendo o transporte da molécula de colesterol, estimulando assim a esteroidogénese. (13)

O farmacêutico não está envolvido diretamente no tratamento de patologias relacionadas com o foro psicológico, como por exemplo da depressão, mas é importante a sua familiarização com este tipo de doenças, a fim de garantir a segurança e o bem-estar dos doentes. O farmacêutico por vezes é o único profissional de saúde que contacta com o doente, principalmente os que exercem as suas funções junto da comunidade, (farmácia comunitária) e como profissional de saúde que é, tem a capacidade e a responsabilidade de identificar

situações com necessidade de especial atenção, facilitando ao doente o acesso a cuidados médicos.

Frequentemente, as pessoas vêm no farmacêutico um psicólogo, uma pessoa de confiança que é capaz de solucionar os seus problemas sem precisar de recorrer a outros profissionais de saúde, desta forma o farmacêutico não está envolvido no tratamento destas patologias, mas pode conversar com o doente de modo a informá-lo, esclarecê-lo ou até mesmo encorajá-lo a procurar tratamento se for o caso. Contudo é necessária uma adequada preparação do farmacêutico para que esteja devidamente informado e seja capaz de esclarecer todas as dúvidas que o doente possa ter.

Além disso, o farmacêutico enquanto especialista do medicamento contém um leque de conhecimentos científicos específicos indispensáveis na boa prática farmacêutica, ajudando-o também no seu principal papel, que é ser um conselheiro próximo de todos os cidadãos.

7. Referências Bibliográficas

- (1) RAHMANI, B. *et al.* (2016) - Neurosteroids; potential underpinning roles in maintaining homeostasis. **General and comparative endocrinology**. 225, 242–50. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.09.030.
- (2) ZORUMSKI, C. F. *et al.* (2013) - Neurosteroids, stress and depression: potential therapeutic opportunities. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 37, 109–22. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.10.005.
- (3) VALLÉE, M. (2016) - Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone. **steroid Biochem Mol Biol**. 160, 78-87 doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.09.030.
- (4) GUENNOUN, R. *et al.* (2015) - Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**. 146, 48–61. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.09.001.
- (5) VALLÉE, M. (2014) - Structure-activity relationship studies on neuroactive steroids in memory, alcohol and stress-related functions: a crucial benefit from endogenous level analysis. **Psychopharmacology**. 231, 3243–55. doi: 10.1007/s00213-014-3593-3.
- (6) MIDZAK, A. *et al.* (2011) - Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria. **Molecular and cellular endocrinology**. 336, 70–9. doi: 10.1016/j.mce.2010.12.007.
- (7) REDDY, D. S.; ESTES, W. A. (2016) - Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**. xx, 1–19. doi: 10.1016/j.tips.2016.04.003.
- (8) DOR, R. BEN *et al.* (2015) - DHEA metabolism to the neurosteroid androsterone: a possible mechanism of DHEA's antidepressant action. **Psychopharmacology**. 232, 3375–83. doi: 10.1007/s00213-015-3991-1.

- (9) REDDY, D. S. (2014) - Neurosteroids and their role in sex-specific epilepsies. **Neurobiology of disease**. 72 Pt B, 198–209. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.010.
- (10) GUNN, B. G. *et al.* (2015) - GABAA receptor-acting neurosteroids: a role in the development and regulation of the stress response. **Frontiers in neuroendocrinology**. 36, 28–48. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.06.001.
- (11) BERMACK, J. E.; DEBONNEL, G. (2005) - Critical Review The Role of Sigma Receptors in Depression. , 336, 317–336.
- (12) QIU, Z.-K. *et al.* (2015) - The role of allopregnanolone in the anxiolytic-like effect of free and easy wanderer plus (FEWP), a polyherbal preparation. **Neuroscience letters**. 595, 94–8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.03.039.
- (13) SCHÜLE, C.; NOTHDURFTER, C.; RUPPRECHT, R. (2014) - The role of allopregnanolone in depression and anxiety. **Progress in Neurobiology**. 113, 79–87. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.09.003.
- (14) AGI, R. C. *et al.* (2006) - Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. , 103.
- (15) BIANCHI, M.; BAULIEU, E. (2012) - Correction for Bianchi and Baulieu, 3-Methoxy-pregnenolone (MAP4343) as an innovative therapeutic approach for depressive disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 109, 4708–4708. doi: 10.1073/pnas.1202752109.
- (16) FRAU, R. *et al.* (2015) - Targeting neurosteroid synthesis as a therapy for schizophrenia-related alterations induced by early psychosocial stress. **Schizophrenia research**. 168, 640–8. doi: 10.1016/j.schres.2015.04.044.
- (17) JANMAAT, S. *et al.* (2011) - Age-related Purkinje cell death is steroid dependent: ROR α haplo-insufficiency impairs plasma and cerebellar steroids and Purkinje cell survival. **Age (Dordrecht, Netherlands)**. 33,, 565–78. doi: 10.1007/s11357-010-9203-3.

(18)KORINEK, M. *et al.* (2011) - Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. **Steroids**. 76, 1409–18. doi: 10.1016/j.steroids.2011.09.002.

(19)SEGEBLADH, B. *et al.* (2013) - Allopregnanolone serum concentrations and diurnal cortisol secretion in women with premenstrual dysphoric disorder. **Archives of women's mental health**. 16, 131–7. doi: 10.1007/s00737-013-0327-1.

(20)FR, P.; ROBEL, P. (2011) - United States Patent. , 2, 12.