VITOR FELITTI

EFEITO DO DHEA SOBRE APOPTOSE E A RESPOSTA DO RETICULO SARCOPLASMÁTICO AO ESTRESSE CELULAR INDUZIDOS POR PALMITATO EM MIOTUBOS L6

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia Humana

São Paulo 2017

VITOR FELITTI

EFEITO DO DHEA SOBRE APOPTOSE E A RESPOSTA DO RETICULO SARCOPLASMÁTICO AO ESTRESSE CELULAR INDUZIDOS POR PALMITATO EM MIOTUBOS L6

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em LFisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia Humana.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Versão Original

São Paulo 2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Felitti, Vitor DHEA REDUZ A APOPTOSE E MODULA A RESPOSTA DO RETICULO SARCOPLASMÁTICO AO ESTRESSE CELULAR INDUZIDOS POR PALMITATO EM MIOTUBOS L6 / Vitor Felitti; orientador Carla Roberta de Oliveira Carvalho de Oliveira Carvalho. -- São Paulo, 2017. 65 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Desidroepiandrosterona. 2. Músculo esquelético. 3. Ácido graxo. 4. Apoptose . 5. Estresse de Retículo. I. de Oliveira Carvalho, Carla Roberta de Oliveira Carvalho, orientador. II.

Título.

Candidato(a): Vitor Felitti

(

Titulo da Dissertação/Tese: EFEITO DO DHEA SOBRE APOPTOSE E A RESPOSTA DO RETICULO SARCOPLASMÁTICO AO ESTRESSE CELULAR INDUZIDOS POR PALMITATO EM MIOTUBOS L6

Orientador: Pr^a Dr. Carla Roberta de Oliveira Carvalho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a, considerou o(a) candidato(a):

) Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitària "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: ccp@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 496/11 referente ao projeto intitulado: "Avaliação dos efeitos do DHEA/DHEA-S sobre fatores influenciadores da síntese e degradação proteica em miotubos de linhagens celular L6" sob a responsabilidade de Vitor Felitti, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 07 de dezembro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, Marta e Domingos a minha companheira, Daniele e aos queridos filhos Clara e Artur dedico.

AGRADECIMENTOS GERAIS

Aos meus pais, Marta e Domingos, pelo amor incondicional, pelos valores passados com tanto carinho, por me guiarem e apresentarem o verdadeiro sentido da vida, pelas quais tenho muito amor, respeito e admiração.

A Daniele, minha eterna companheira e amiga, pelo amor e ajuda incansável, pelo exemplo de convicção e integridade, pela maravilhosa convivência.

À Professora Carla Roberta, pela oportunidade dada, pela orientação, pela paciência e apoio nos momentos difíceis na iminência de entregar a tese.

Aos Professores Ângelo Carpinelli, Silvana Bordin, Rui Curi e Marcelo Muscara e pela acolhida em seu laboratório para a realização de análises fundamentais ao desenvolvimento desta Tese.

A todos os colegas de laboratório, Gabriela, Mario, Marilu, Layane, Bruna pela convivência durante este período.

E em, especial, ao mestre, com carinho, Dr. Celso Charuri (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida, número do processo 140172/2002-2.

O conhecimento científico tem por objetivo iluminar o caminho da humanidade, tirando-a das trevas. O pesquisador científico tem por objetivo, trazer à luz da ciência, apenas os fatos encontrados segundo sua capacidade de compreensão. Cabe à humanidade, de posse desses fatos, traçar seus novos caminhos em busca de uma verdade absoluta. Construirão, com certeza, um mundo bem melhor.

Domingos Felitti

RESUMO

FELITTI, V. **DHEA reduz a apoptose e modula a resposta do retículo sarcoplasmático ao estresse celular induzidos por palmitato em miotubos.** 2017. 61f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A desidroepierosterona (DHEA) é um hormônio esteroide produzido pelas glândula adrenal e gônadas em humanos e pelas gônadas em roedores. Há evidências demonstrando efeitos anti-obesidade, antiinflamatórios e antioxidativos, bem como uma relação com a resistência à insulina em condição como a síndrome dos ovários policísticos, além de ser precursor dos esteroides sexuais. No presente trabalho foi avaliando o efeito do DHEA sobre a citotoxicidade induzida 0.5 mM de palmitato em miotubos L6, usando 2 concentrações distintas para o esteroide, uma próxima à fisiológica (10 nM) e outra supra-fisiológica (100 nM) por 12h. Foram avaliados parâmetros: viabilidade celular, apoptose, vias intracelulares envolvidas na apoptose, no estresse de retículo endoplasmático e estado de estresse oxidativo. Os resultados obtidos foram: viabilidade celular, índice apoptótico, expressão proteica por immunoblotting e slot blot. A incubação com 10 nM e 100 nM de DHEA apresentou o aumento da viabilidade celular, redução índice de apoptose avaliado pela relação da expressão de caspase-3 e sua forma clivada, induzida pelo palmitato;. Ademais, ambas as concentrações de DHEA reduziram o estresse de retículo induzido por palmitato via Perk/eif2a/CHOP. Além disso o DHEA impediu o aumento da expressão de iNOS, assim como impediu o aumento de proteína nitrosiladas induzidas por palmitato. Os resultados obtidos nos permitem concluir que o DHEA em concentrações fisiológicas 10 nM e em concentrações suprafisiológicas 100 nM, simulando o excesso desse esteroide em condição como a SOP tem efeitos anti-apoptótico, regulador da resposta do retículo sarcoplasmático ao estresse celular. Ademais, DHEA se mostrou eficaz na redução do estresse oxidativo. Assim, consideramos ser provável que os resultados obtidos ampliarão a compreensão dos efeitos fisiológicos do DHEA para além de um simples precursor dos esteroides sexuais.

Palavras-chave: Desidroepiandrosterona - Músculo esquelético - Ácido graxo – Apoptose - Estresse de Retículo.

ABSTRACT

FELITTI V. **DHEA reduces apoptosis and modulates the response of palmitateinduced cellular stress in the sarcoplasmic reticulum of L6 myotubes**. [thesis (Doctorate in Human Physiology)] Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo; 2017.

Dehydroepierosterone (DHEA) is a steroid hormone produced by the adrenal gland, in humans, and by the gonads, in rodents. Besides being a sexual steroid precursor, there is evidence indicating that DHEA possesses anti-obesity, anti-inflammatory and antioxidative properties. DHEA may also play a role in insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. In this study, the effect of DHEA on palmitate-induced cytotoxicity in L6 myotubes was evaluated using two concentrations of DHEA: (1) physiological (10nM) and (2) supra-physiological (100nM) for 12 hours. The L6 myotubes were then evaluated for: cell viability, apoptosis, intracellular apoptotic pathways, endoplasmic reticulum (ER) stress, and oxidative stress. Incubation with either 10nM or 100nM DHEA protected the L6 myotubes from palmitate-induced cytotoxicity by as evidenced by increased cell viability, and a reduced apoptosis index (assessed by the ratio of expression of caspase-3 and its cleaved form). In addition, both concentrations of DHEA reduced palmitate-induced ER stress through the Perk/eif2a/CHOP pathway. Furthermore, DHEA prevented the increase of iNOS expression, and also prevented the increase in nitrated protein induced by palmitate. These data indicate that DHEA-at physiological and supra-physiological concentration has anti-apoptotic effects and can modulate the response of sarcoplasmic reticulum to cellular stress, in L6 myotubes. In addition, DHEA proved to be effective in reducing oxidative stress. Together, these results demonstrate that in addition to DHEA being a sexual steroid precursor, it is also capable of increasing cell viability, through the reduction of apoptosis, ER stress, cellular stress, and oxidative stress

Keywords: Dehydroepiandrosterone. Skeletal muscle. Fatty acid. Apoptosis. Reticle Stress

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Concentração de DHEAS em humanos ao longo da vida (WILLIAN

	et al., 2002)	2
Figura 2.	Esquema da ativação das proteínas localizadas na membrana do RER ativadas em resposta ao estresse de retículo	3
Figura 3.	Esquema representativo dos fatores indutores do estresse do retículo endoplasmático (ER) e as vias centrais ativadas a partir dessa resposta	8
Figura 4.	Leituras referentes à contagem de células L6 (não diferenciadas) realizadas em câmara de Neubauer de um mesmo ensaio por observadores distintos (r = 0,996; P < 0,001, correlação de Spearman)	8
Figura 5.	Leituras referentes à contagem de células L6 (não diferenciadas) realizadas em câmara de Neubauer de um mesmo ensaio por um único observador (r = 0,997; P < 0,001, correlação de Spearman)	25
Figura 6.	Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do DHEA e do palmitato em miotubos diferenciados de mioblastos L6	26
Figura 7.	Efeito do palmitato na viabilidade celular dos miotubos L6 incubados com 0,5mM, 1mM e 2mM por 12h consecutivas. * Indica diferença em comparação ao grupo controle, ^o indica diferença em comparação ao grupo 0,5mM e # indica diferença em comparação ao grupo 1mM, p<0,05. O gráfico representa as médias ± o erro padrão, (n=4 experimentos independentes)	26

Figura 1 -	Concentração	de	DHEAS	em	humanos	ao	longo	da	
	vida)								15

- Figura 5 Leituras referentes à contagem de células L6 (não diferenciadas)
 realizadas em câmara de Neubauer de um mesmo ensaio por um
 único observador (r = 0,997; P < 0,001, correlação de Spearman)..... 28
- Figura 6 Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do DHEA e do palmitato em miotubos diferenciados de mioblastos L6.... 29
- Figura 7 Efeito do palmitato na viabilidade celular dos miotubos L6 incubados com 0,5 mM, 1 mM e 2 mM por 12h consecutivas. * Indica diferença em comparação ao grupo controle, ^o indica diferença em comparação ao grupo 0,5 mM e # indica diferença em comparação ao grupo 1 mM, p<0,05. O gráfico representa as médias ± o erro padrão, (n=4 experimentos independentes)......
- Figura 8 Efeito da incubação com 10 nM, 100 nM e 10 uM de DHEA por 12h
 e 36h consecutivas sobre a viabilidade celular dos miotubos L6 (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, p<0,05.

36

O gráfico representa as médias ± o erro padrão...... 37

38

40

- Figura 9 Efeito do DHEA sobre a viabilidade celular, apoptose e necrose de miotubos L6. (A) Efeito da incubação com DHEA 10 nM (low) e DHEA 100 mM (high) por 12h sobre a viabilidade celular dos miotubos L6 por citometria de fluxo (n=5). (B) Imagens representativas de microscopia de fluorescência, em azul com o corante Hoescht e em vermelho o marcador lodeto de propídeo. (IP) (C) e (D) Representação gráfica dos dados da microscopia de fluorescência marcados com Hoechst à esquerda e PI à direita (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.....
- Figura 10 Efeito do DHEA sobre a toxicidade induzida pelo palmitato nos miotubos L6. (A) Efeito da incubação com palmitato, DHEA low+Palm e DHEA high+palm por 12h sobre a viabilidade celular dos miotubos L6 por citometria de fluxo (n=5). (B) Imagens representativas da microscopia de fluorescência, em azul com o corante Hoescht e em vermelho com iodeto de propídeo (IP). (C) e (D) Representação gráfica para microscopia de fluorescência marcados com Hoechst à esquerda e IP à direita (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, # Indica diferença em comparação ao grupo palmitato, p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão....
- Figura 11 Efeito do DHEA e palmitato na expressão proteica de Caspase 3 e Akt de miotubos L6. (A) Imagem representativa dos immunoblotting típicos para Caspase 3, Caspase 3-clivada, Akt total e p-Akt (fosfoserina 473, ser473). (B), Efeito do DHEA e palmitato na razão Caspase 3 clivada/Caspase 3 (C) e (D) Efeito da administração de DHEA e palmitato sobre a expressão proteica de Caspase-3 e Caspase-3 clivada e relação entre p-Akt e Akt total em miotubos L6 (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, # Indica 42

diferença em comparação ao grupo palmitato, a significância considerada para p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.....

Figura 12 -Efeito do DHEA e palmitato sobre a expressão protéica e grau de fosforilação de proteínas relacionadas a resposta do retículo endoplasmático ao estresse celular (ERE. (A) Imagem representativa dos immunoblotting típicos para Bip, p-Perk, Perk, peifaα, eif2α, ATF4, CHOP, GADD34. Representação gráfica do efeito do DHEA e palmitato sobre a expressão proteica de Bip (B), da razão p-Perk e Perk (C), da razão p-eifaa e eif2a (D), da expressão do ATF4 (E), da expressão proteica de CHOP (F) e da expressão de GADD34 (G) em miotubos L6 (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, # Indica diferença em comparação ao grupo palmitato, a significância considerada para p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.....

44

46

- Figura 13 Efeito do palmitato e do DHEA sobre a nitração de proteínas celulares e sobre a expressão proteica de iNOS. (A) Imagem representativa do slot blot para proteinas nitradas. (B) Decurso temporal da nitração de proteínas celulares após 1, 3, 6 e 12h de incubação com DHEA e palmitato em miotubos L6 (n=3). (C) Área total sob a curva do decurso temporal de nitração de proteinas. (D) Efeito da administração de DHEA e palmitato sobre a expressão proteica de iNOS,(n=4).* Indica diferença em comparação ao grupo controle, p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.....</p>

SUMÁRIO

1.1 Dehidroepiandrosterona	15
1.2 Tecido muscular esquelético	17
1.3 Estresse de Retículo Endoplasmático	19
2 OBJETIVO	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Materiais	26
3.2 Linhagem celular	26
3.2.1 Propagação e Diferenciação das Células	26
3.2.2 Microscopia óptica	27
3.2.3 Variação intra e inter-observador na contagem de células L6	27
3.3 Protocolo experimental	28
3.4 Viabilidade celular	29
3.4.1 Método de exclusão por Trypan Blue	29
3.4.2 Citometria de Fluxo	31
3.4.3 Análise Morfológica de morte celular	31
3.5 Western Blot	32
3.6 Slot Blot	33
3.7 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	35
4.1 Efeito citotóxico de Palmitato e DHEA sobre miotubos diferenciados	35
4.1.1 Determinação das concentrações a serem utilizadas de Palmitato e DHEA	35

4.1.2 Efeito do DHEA sobre a toxicidade induzida pelo palmitato	39
4.2 Expressão e Nitração Proteica	41
4.2.1 Efeito do DHEA e Palmiato sobre a expressão protéica de Caspase-3, Caspase-3 clivada, Akt total e sobre o grau de fosforilação da Akt	41
4.2.2 Efeito do DHEA e Palmiato sobre a expressão protéica e grau de fosforilação de proteínas relacionadas a resposta do retículo endoplasmático ao estresse celular (ERE): Bip, p-Perk, Perk, p-eif2α, eif2α, ATF4, CHOP, GADD34	42
4.2.3 Efeito do palmitato e do DHEA sobre a nitração de proteínas celulares e sobre a expressão proteica de iNOS	45
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
	59
A - Efeito do DHEA sobre a apoptose e necrose nos miotubos L6. As células foram submetidas a incubação com DHEA low DHEA high e DHEA 10 uM por 36 h e12 h.	59
B - Efeito do DHEA sobre a apoptose e necrose induzida pelo palmitato nos miotubos L6. As células, foram submetidos a incubação com palmitato 12 h, de DHEA low + Palm , DHEA high + Palm e DHEA 10 uM + Palm por 36 h e12 h	60
C - Efeito do DHEA e palmitato sobre a expressão protéica de proteínas relacionadas a via de síntese Proteica. Representação gráfica do efeito da incubação por 36h de DHEA nas concentrações 10 nM e 100 nM e palmitato 0,5 mM por 12 h sobre a expressão proteica de Akt , mTor ,p70s6k	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dehidroepiandrosterona

Dehidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfatada, DHEAS, são os esteroides mais abundantes circulantes tanto em homens quanto em mulheres. A ordem de grandeza da concentração sanguínea de DHEAS está na faixa de microgramas (ou nmol/L), enquanto para o DHEA, nanogramas (ou nmol/L). O DHEAS é a forma mais estável e corresponde a um reservatório circulante de DHEA. Cerca de 90 a 95% do DHEAS é produzido pela zona reticular do córtex adrenal, e o restante é sintetizado principalmente pelas gônadas. Tanto o córtex adrenal quanto o fígado são os principais sítios de sulfatação do DHEA, através da atividade da enzima sulfotransferase, SULT2A1. Uma vez sulfatado o DHEA não é alvo da ação de enzimas da esteroidogênese, e, portanto, não é convertido a androstenediona e testosterona. Por outro lado, o DHEAS pode ser desulfatado por ação de enzimas sulfatases de esteroides (JONATHAN et al.,2015). Esses esteroides apresentam baixa ação androgênica e atuam principalmente como precursores dos hormônios sexuais, testosterona e estrogênios (LABRIE et al., 2005).

O DHEAS apresenta um perfil oscilatório nos níveis plasmáticos ao longo da vida sendo as maiores concentrações na vida intrauterina, período neonatal e na fase de adulto jovem (Figura 1), A partir do início da idade adulta há um gradativo e contínuo declínio desses esteroides até atingirem valores próximos a 20 % do máximo, ao redor da sétima década de vida (ORENTREICH et al.,1984; PARKER JR. 1999;).





A administração de DHEA a modelos animais apresenta, entre outros, efeito antiobesidade induzida por dieta hiperlipídica (HANSEN et al., 1997), efeito antidiabetogênico induzido por aumento da sensibilidade à insulina em ratos adultos normais ou obesos (CAMPBELL et al., 2004; RICHARDS; PORTER; SVEC, 2000), induz modificações morfológicas importantes nas células das ilhotas pancreática secretoras de insulina, exibindo aumento da massa das células-β pancreáticas e uma melhora na capacidade em secretar insulina (MEDINA et al., 2006) e aumento do gasto energético acompanhado de aumento da expressão gênica do fator transcricional PGC-1 em tecido adiposo marrom (RYU et al., 2003).

Este fator transcricional está relacionado a biogênese mitocondrial, sendo encontrado principalmente em tecidos com alta demanda energética como músculos estriados, cardíaco e esquelético, rins, fígado e cérebro, além do tecido adiposo marrom (KNUTTI; KRESSLER; KRALLI, 2001).

Diferente de outros hormônios esteroides não foi identificado um receptor específico para DHEA. Evidencias experimentais recentes demonstraram sua interação no tecido hepático e *in vitro* com receptores intracelulares de estrógenos (ER α e ER β) e de andrógeno (AR) (TENG et al.,2014), bem como com o receptor de membrana para estraidol GPR30 (*G protein-coupled estrogen receptor 1*) (KLINGE, et al., 2014). Além disso, há dados demonstrando que várias das atividades biológicas do DHEA requerem da presença do PPAR α (*peroxisome proliferator activated receptor α*). Contudo, nenhuma das isoformas do PPAR parece funcionar como receptor para este hormônio (DILLON et al., 2000; PETERS et al., 1996).

Ademais, tanto o DHEA quanto o DHEAS são potentes inibidores não competitivos da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em células de mamíferos *in vitro* (SHANTZ, et al., 1989) e *in vivo* (SCHUWARTZ; PASHKO, 1993).

A G6PD é a primeira enzima que regula a via das pentoses. Essa via é a principal fonte de ribose 5-fosfato e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina na forma reduzida (NADPH) extra mitocondrial (GORDON, et al., 1995). Por sua vez, A NADPH é um modulador crítico redutor de diversas enzimas envolvidas na geração de radicais livres de oxigênio, tais como, óxido nítrico sintase (MARLETTA, 1994) e catalases da formação de radicais hidroxilas a partir do peróxido de

hidrogênio - H₂O₂, entre outras. Como consequência, a diminuição dos níveis de NADPH pode ter profundo impacto na produção dos radicais livres.

Por outro lado, a produção elevada de radicais livres provoca um desequilíbrio pró-oxidante ocasionando um quadro de estresse oxidativo, contribuindo para instalação de um processo inflamatório e para apoptose (COUSSENS; WERB, 2002; ISCHIROPOULOS; BECKMAN, 2003). Há evidências obtidas a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* indicando efeito inibitório do DHEA sobre processos inflamatórios através de seu efeito sobre a G6PDH e formação de radicais livres (SCHWARTZ; PASHKO, 2004). Além disso, há dados demonstrando papel antioxidante do DHEA em situações de hiperglicemia aguda ou crônica (ARAGNO et al., 2002), em tecido muscular de ratos com DM induzido por estreptozotocina (ARAGNO et al., 2004) e em tecido nervoso central (BROWN et al., 2003; MORIN et al., 2002).

Mais recentemente, sugiram as primeiras evidências de que o músculo esquelético, juntamente com as gônadas, adrenais, mucosa gástrica, placa de crescimento tibial e o cérebro também expressam enzimas esteroidogênicas. Dessa forma, o músculo esquelético se constitui numa importante fonte extragonadal de esteróides sexuais por ser capaz de sintetizar localmente testosterona e estradiol a partir do DHEA de maneira dose-dependente (AIZAWA et al., 2007).

Foi demonstrado que o DHEA e DHEA-S desempenham um papel importante em relação à longevidade em humanos (ROTH et al., 2002), uma vez que atua inibindo a apoptose através da via da PI-3 cinase\AKT (ZANGH et al.,2002). Campbell et al. (2004) demonstraram que o tratamento com DHEA causa um aumento do grau de fosforilação de proteínas envolvidas no sinal intracelular da insulina tanto no fígado quanto no músculo esquelético.

Estudos *in vitro* demonstraram um efeito eficaz do DHEA-S sobre a manutenção da massa muscular esquelética, uma vez que miotubos de linhagem C2C12 tratados com DHEA-S apresentaram redução da expressão de marcadores de degradação proteica ubiquitina ligase (E3 ligase) MuRF-1 e aumento da expressão de miosina de cadeia pesada (CECI et al., 2011).

1.2 Tecido muscular esquelético

Em indivíduos eutróficos, o tecido muscular esquelético representa 40 a 50% da massa corporal total e aproximadamente 75% da massa corporal magra. A manutenção adequada dessa massa muscular depende do constante balanço entre síntese e degradação proteica, portanto, o aumento da massa muscular esquelética pode ocorrer devido à elevação da taxa de síntese proteica ou pela queda da degradação, enquanto que a diminuição dessa massa tecidual pode ser influenciada pela inversão desses fatores (GUMUCIO et al., 2012).

O tecido muscular esquelético é responsável pelo consumo de 20 a 30 % do oxigênio em repouso e contribui com a homeostase glicêmica, uma vez que capta aproximadamente 75 % de toda glicose sanguínea induzida pela insulina (STUMP et al., 2006), sendo, portanto, considerado um tecido importante na homeostasia orgânica (SMITH; MUSCAT, 2005).

Distúrbios metabólicos relacionados a resistência à ação da insulina no tecido muscular apresentam como mecanismos celulares comprometimento dos componentes iniciais da cascata de sinalização da insulina (PETERSEN; SHULMAN, 2006), aumento do conteúdo de triglicerídeos intramusculares (KELLEY et al., 2002; LEVIN et al., 2001), queda na habilidade da insulina em regular a utilização de combustíveis celulares (BREHM et al., 2006; KELLEY; MADARINO, 2000; STUMP et al., 2003;) e presença de estresse oxidativo (EVANS et al., 2003; HOUSTIS et al., 2006).

O acúmulo de ácidos graxos livres intramuscular (AGL) apresenta efeitos sobre a resistência a insulina (RI) e apoptose. Os potenciais candidatos que medeiam os efeitos dos AGL de cadeia saturada no músculo esquelético incluem: aumento do estresse oxidativo (HOEHN et al.,2008; LAMBERTUCCI et al., 2008) ativação de fatores pró-inflamatório (WEIGERT et al., 2004), disfunção mitocondrial, aumento no índice de apoptose, a inibição da sinalização de insulina e redução na captação de glicose (RACHEK et al.,2007).

Evidências *in vitro* indicam que níveis elevados de ácido graxo livre apresentam diversos efeitos deletérios sobre a mitocôndria, além do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) tal como o ânion superóxido (BAKKER et al., 2000), o comprometimento das defesas antioxidantes endógenas pela diminuição intracelular de glutationa (HENNIG et al., 2000; TOBOREK et al.,1994). Em humanos, as concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados podem variar consideravelmente, dependendo da idade, estado de jejum e estado de saúde. Em diversos estudos clínicos, a média diária de ácidos graxos no soro varia de 0,4 a 0,6 mM para indivíduos eutróficos. Em pessoas com obesidade e DM não dependentes de insulina apresentam concentrações de ácido graxos de aproximadamente 1 mM durante o jejum. Por outro lado, pessoas com DM e cetonúria têm concentrações de ácidos graxos ainda maiores, atingindo valores iguais ou superiores a 1,5 mM. Quando os valores de ácidos graxos no soro humano atingem 1 mM, a concentraçõe de palmitato atinge valores de 0,25 mM (HUNNICUTT J.W., et al 1994).

O tecido muscular esquelético é particularmente vulnerável à produção excessiva de ROS, tanto por apresentar grande consumo de oxigênio na produção de ATP por vias oxidativas (ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória) quanto como resultado da atividade contrátil (RACHEK et al., 2007).

O excesso de ROS e de espécies reativas de nitrogênio (RNS) podem induzir oxidação de proteínas, lipídeos e DNA, danificando-os (RACHEK et al., 2007; VAZEILLE et al., 2008). No entanto, há evidências demonstrando que para uma ótima função contrátil da musculatura esquelética é fundamental a presença de concentrações baixas de intermediários de ROS, que atuariam para a manutenção da homeostase redox desse tecido (REID; KHAWLI; MOODY,1993).

Estudos *in vitro* demonstraram que miotubos L6 tratados com ácido palmítico em diferentes concentrações apresentaram elevada produção de ROS e concomitante degeneração do DNA mitocondrial e redução na produção de ATP. Estes fatores desencadearam o aumento da apoptose nesses miotubos (RACHEK et al., 2007).

Ainda, no estudo de Rachek et al. (2007), foi demonstrado aumento na expressão proteica da sintase induzível de óxido nítrico (iNOS) e aumento da produção de RNS.

1.3 Estresse de Reticulo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela muito complexa que apresenta um papel fundamental em diversos processos celulares. Dentre eles, biossíntese de quase um terço das proteínas intracelulares em eucariotos, modificação conformacional de proteínas através do dobramento das moléculas recém-sintetizadas e armazenagem de íons cálcio (REID et al., 2015).

O RE é formado por um sistema de membranas contínuas ao qual fazem parte o RE periférico, definido por regiões planas e ramificações tubulares e o envoltório nuclear. As distribuições dessas regiões do RE são reguladas por uma variedade de proteínas integradas da membrana e interações com outras organelas e o citoesqueleto. Essas interações apresentam origem dinâmica ocasionam mudanças dentro da célula, tanto através do ciclo celular quanto do estado do desenvolvimento, diferenciação celular, sinais (SCHWARS; BLOWER, 2015).

No processo de dobramento das proteínas recém-sintetizadas há participação de proteínas residentes ou que migram para o RER pertencentes à família denominada proteínas chaperonas. Estas atuam como mediadores do processo e estão envolvidas na glicosilação e na catálise das reações que criam as pontes de disulfeto (BRAAKMAN; HEBERT, 2013). O resultado adequado dessa atividade permitirá que apenas as proteínas com conformação ideal sigam ao estágio seguinte e sejam destinadas às organelas intracelulares, membrana plasmática ou ao meio extracelular.

Esse processo de dobramento é bastante suscetível a fatores como infecções virais, estado inflamatório, homeostase redox, homeostase de cálcio, estado metabólico e até mesmo pelo aumento da síntese proteica estimulados por nutrientes. Qualquer um desses fatores isoladamente ou em conjunto pode desencadear uma resposta de estresse dessa organela.

A resposta de estresse do RE constitui um mecanismo adaptativo, cujo resultado é manter um equilíbrio entre síntese de proteínas e a capacidade de manter a configuração tridimensional correta das proteínas (do inglês, *folding*) presentes no RE. Nesse sentido, um desequilíbrio entre a capacidade e a necessidade de *folding* de proteínas no RE levaria a ativação da resposta do estresse do retículo endoplasmático, causado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas (*unfolded protein response,* UPR) (EIZIRIK et al., 2008).

Em princípio, a UPR tem por objetivo reestabelecer o funcionamento normal do RE, dispondo de múltiplas estratégias que agem simultaneamente, ora sequencialmente variando de acordo com a intensidade de estresse causado (ABDULKARIM et al., 2008)

No entanto, se a resposta adaptativa ao excesso de proteínas mal dobradas não for ativada, a consequência poderá ser ativação de vias intracelulares que resultam em apoptose celular (EIZIRIK et al., 2008). Assim, o mecanismo de adaptação à URP envolve a ativação de um sistema de degradação de proteínas associado ao RE (ERAD). Uma vez ativada a ERAD haverá redução das proteínas mal dobradas, reestabelecendo-se a homeostase (RUGGIANO et al., 2014).

Dois outros eventos estão associados à UPR: (1) o aumento da expressão de proteínas chaperonas e (2) ativação de proteínas localizadas na membrana do RE.

Algumas chaperonas utilizam ATP para promover o dobramento adequado e evitar a agregação de proteínas no lúmem do RE. Dessa maneira, tais chaperonas atuarão como sinalizadoras da função reticular (BERTOLOTTI et al., 2013; BRAVO et al., 2011;).

As 3 proteínas da membrana do RE ativadas como parte da URP são: PERK (protein kinase eukaryotic *R*-like initiation factor 2a kinase), IRE1 (inositol-requiring enzyme1), ATF6 (activating transcription factor). Essas proteínas culminam com a super-regulação de genes codificadores das proteínas chaperonas do ER (Figura 2).

Entretanto, dentre as três prováveis vias iniciadoras da resposta ao estresse no RE foi estabelecido anteriormente que a via da PERK é a induzida por altas concentrações de ácido graxo de cadeia saturada e está relacionada a este efeito citotóxico (CUNHA et al, 2008).



Figura 2 - Esquema da ativação das proteínas localizadas na membrana do RER ativadas em resposta ao estresse de retículo. ATF6 – fator ativador de transcrição 6; PERK - protein kinase RNAlike endoplasmic reticulum kinase); eIF2a - Eukaryotic Initiation Factor; ATF4 - fator ativador de transcrição 4; CHOP - CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein; IRE 1 - Inositolrequiring enzyme 1; TRAF2 - TNF receptor associated factor; JNK - c-Jun N-terminal kinases; sXBP-1 - spliced X-box-binding protein-1 (Velasco 2010).

A via da PERK é iniciada pela dissociação entre essa proteína e a chaperona BiP (*immunoglobulin heavy-chain binding protein*), também conhecida por GPR78 (*glucose-regulated protein (GRP)78*). Essa dissociação permite a dimerização da PERK, que se autofosforila e amplia sua atividade quinase (HARDING et al, 2000).

A PERK ativada induz a fosforilação do fator de iniciação de tradução eIF2α (*factor of initiation of translate eucariotic 2α*). O eIF2α fosforilado induzirá o aumento na expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas no dobramento proteico como o fator de transcrição ATF4 (fator ativador de transcrição 4) e ao mesmo tempo interferirá no processo de traducional desencadeando redução ou inibição da síntese de novas proteínas (; HARDING et al 2001; SONENBERG, 2005).

A proteína a jusante do ATF4, GADD34 (growth arrest and DNA damage inducicle gene), medeia a defosforilação de elf2α, atenuando assim a repressão da síntese proteica (HARDING et al, 2003). Por outro lado, se o estresse for exacerbado ou prolongado e a homeostase do RE não for restaurada, haverá aumento da expressão de outra proteína denominada CHOP (*C\EBP homologus protein*) responsável por deflagrar o processo apoptótico (MARCINIAK; RON, 2006)

CHOP foi a primeira proteína identificada como componente central da via de apoptose mediada pelo estresse ER. Assim, a partir do exposto anteriormente podese considerar que a via PERK/eIF2a desempenha um papel essencial na indução da proteína CHOP no estresse ER, que por sua vez desencadeará o aumento da apoptose.

A apoptose apresenta um papel na manutenção da homeostase tecidual. A desregulação de processos apoptóticos está envolvida na patogênese de diversas de doenças tais como DM e doenças neuro-degenerativas (KAUFMAN, 2002).

Estudo com pacientes diabéticos identificou marcadores de UPR aumentados em células isoladas a partir de biópsias musculares e cultivadas na presença de palmitato (PETER et al., 2009). Aqueles dados indicaram que o estresse de RE pode ser induzido em músculo esquelético de humanos *in vivo*. Em 2010, Deldicque et al. confirmaram a presença de estresse de RE em células musculares humanas acompanhada de redução na expressão da proteína mTOR, elemento central na síntese proteica e manutenção da massa muscular esquelética.

Outro importante estudo demonstrou que camundongos alimentados após 18 semanas com dieta hiperlipídica apresentam aumento significativo da expressão gênica de marcadores de estresse de RE tais como CHOP e XBP1 não somente no músculo esquelético, mas também em fígado e tecido adiposo subcutâneo (PIERRE et al.,2013).

Assim, tem sido proposto que o estresse de reticulo apresenta uma rápida resposta a estímulos externos e tem papel importante na modulação direta da síntese proteica e sobre a apoptose, consequentemente, na manutenção do tecido muscular esquelético (MADARO, 2013) (Figura 3).



Figura 3 - Esquema representativo dos fatores indutores do estresse do reticulo endoplasmático (ER) e as vias centrais ativadas a partir dessa resposta. **mTORC1**: complexo proteico 1 alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin complex 1*) (Adaptado Deldicque et al., 2013)

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do DHEA sobre a citotoxicidade induzida por palmitato em células musculares de linhagem L6.

Para tanto foram utilizadas as seguintes estratégias experimentais em miotubos L6 *in vivo*:

- Medida da viabilidade celular:
 - Após incubação com doses diferentes de palmitato pelo método de exclusão corado com Trypan blue;

 Após incubações com DHEA e ou palmitato analisada por citometria de fluxo;

 Avaliação morfológica nuclear para identificação de apoptose e necrose por microscopia de fluorescência com corantes específicos (Hoechst 33342 e lodeto de Propídeo) após incubações com DHEA e ou palmitato;

• Avaliação da expressão proteica por Western blot:

 Das proteínas caspase-3 e AKT e a relação com caspase-3clivada e intensidade da fosforilação no resíduo serina 473 da AKT, respectivamente, consequente às incubações com DHEA e ou palmitato;

 Expressão proteica e fosforilação para posterior relação estequiométrica dos componentes de via específica de estresse de retículo endoplasmático: BiP, p-PERK, PERK, p-elF2α, elF2α, ATF4, CHOP, GADD-34;

• Avaliação do estado oxidativo pela quantificação de proteínas nitradas por Slot blot devido a incubação com DHEA e ou palmitato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (*Richmond, CA*). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditiotreitol (DTT), DHEA, ácido palmítico, albumina, dimetilsulfóxido (DMSO), penicilina, estreptomicina, Hoechst 33342 e lodeto de Propideo (IP) foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (*St. Louis, MO*). O kit comercial para viabilidade celular *ViaCount*® foi fornecido pela *Merck Millipore, (Billerica, Massachusetts, USA*). A membrana de nitrocelulose e o kit comercial com reagentes e anticorpos marcados com peroxidase para detecção de proteínas por quimiluminescência, ECL, foram fornecidos pela *Amersham* (UK).

O palmitato e o DHEA utilizados foram preparados da seguinte maneira: (a) uma solução estoque de 0,1 M de palmitato em etanol 100% foi utilizada para diluições seriadas em Meio Dulbecco MEM isento de SFB, que foi submetida a incubação com 2% de BSA para conjugar o ácido graxo à proteína e, posteriormente ser utilizado nas incubações com os miotubos L6; (b) solução estoque de 0,1 M de DHEA diluído em 4% de DMSO; (c) os controles foram incubados por igual tempo com diluente e BSA (2% de BSA, etanol e DMSO em meio isento de soro) como descrito por Rachek et al. (2007).

3.2 Linhagem Celular

Foram utilizadas células musculares da linhagem L6, provenientes do banco mundial de células ATCC (*American Type Culture Collection*) e adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

3.2.1 Propagação e Diferenciação das Células

Alíquotas de células foram descongeladas e cultivadas em meio Dulbecco MEM (Cultilab, Campinas, Brasil 25 mM de glicose) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino-SFB (*Gibco®-Invitrogen Life Technology*) e penicilina/estreptomicina (10.000 Ul/mL e 10 mg/mL, respectivamente) para propagação (Mitsumoto e Klip, 1992). As células permaneceram em incubadora (*NuAire, Minnesota USA*) com 5 % de CO₂ e a 37 °C, até atingirem confluência de cerca de 70 – 90 %. Nesse ponto, foram transferidas para placas de 6 poços, na quantidade de 5 x 10⁵ células e o meio de propagação foi modificado para meio Dulbecco MEM suplementado com 2 % SFB, a fim de induzir a diferenciação a miotubos (CASTRO BARBOSA et al, 2013; RACHEK et al, 2007;).

3.2.2 Microscopia óptica

Foi utilizado microscópio óptico invertido, sob aumento de 40 vezes, acoplado a uma câmera fotográfica, para capturar as imagens dos miotubos L6 em presença ou não das diferentes concentrações de ácido palmítico e DHEA.

Através da morfologia celular foi possível analisar características como o alongamento celular devido à fusão de células embrionárias (mioblastos), a quantidade de células não aderentes e a concentração de detritos celulares. Tais características definiram o estágio de diferenciação das células músculo esqueléticas.

3.2.3 Variação intra e inter-observador na contagem de células L6

Foi realizada a avaliação da variação intra e inter-observador das leituras para contagem de células L6 totais como forma de tornar o experimento o mais fidedigno em todo seu processo.

A figura 4 ilustra a ocorrência de uma forte associação quando duas leituras de um mesmo experimento foram efetuadas por observadores diferentes (r = 0,996; P < 0,001, correlação de Spearman), indicando que não ocorreu diferença significativa entre as leituras. A figura 5 apresenta a correlação entre as duas leituras, de modo semelhante à figura 4 indicando a semelhança entre as leituras (r =0,997, correlação de Spearmann; P < 0,001).



Figura 4 - Leituras referentes à contagem de células L6 (não diferenciadas) realizadas em câmara de Neubauer de um mesmo ensaio por observadores distintos (r = 0,996; P < 0,001, correlação de Spearman).



Figura 5 - Leituras referentes à contagem de células L6 (não diferenciadas) realizadas em câmara de Neubauer de um mesmo ensaio por um único observador (r = 0.997; P < 0.001, correlação de Spearman).

3.3 Protocolo experimental

Para definição da concentração de ácido palmítico em etapas anteriores, foi necessário o desenvolvimento de uma curva dose dependente de viabilidade celular na qual pôde-se observar o percentual de células viáveis em função de diferentes concentrações de ácido palmítico.

Além disso, foram realizados experimentos para determinação da concentração e tempo de incubação com o esteroide DHEA, após avaliados os

resultados a concentração foi fixada em 10 nM e 100 nM pelo período de 12h concomitantemente ao estresse originado pelo ácido graxo na concentração de 0,5 mM. A partir de então ficaram definidos os parâmetros para o desenho experimental (figura 6).



Figura 6 - Esquema do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do DHEA e do palmitato em miotubos diferenciados de mioblastos L6.

3.4 Viabilidade Celular

3.4.1 Método de exclusão por Trypan Blue

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada após 12 h de incubação, com diferentes concentrações de ácido palmítico, através da contagem de células em suspensão na presença de corante Trypan Blue 0,4 % Gibco® na câmara de Neubauer. A relação entre a quantidade de células mortas e quantidade do total de células presentes nos quatro campos mais externos da câmara, fornece o dado qualitativo de viabilidade celular. As células foram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, estavam incluídas com o Trypan Blue ou apresentavam degeneração em seu formato arredondado.

Para a análise de viabilidade, as soluções foram aspiradas das placas de cultura de seis poços e foram acrescentados 250 uL de tripsina por cinco minutos a

37 °C. Em seguida, foi acrescido 1 mL de DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino às células em suspensão, estas foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas por cinco minutos (800 g), a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Alíquotas de 1 mL desta solução foram transferidas para novos microtubos de 2 mL, aos quais se adicionou 500 µL de solução de azul de Trypan (0,4%) por cinco minutos.

A contagem na câmara de Neubauer de células marcadas ou não com o corante foi realizada em triplicata aplicando-se 20 µL da suspensão celular.

3.4.2 Citometria de Fluxo

Foram semeadas 5 x 10⁵ células por placas de cultivo para avaliar a viabilidade celular após o protocolo experimental já descrito. Após serem tripsinizadas foram alíquotados 20 uL da suspensão celular e adicionado 380 uL de Kit Guava Via Count® (Merck Millipore) e armazenados em temperatura ambiente por cinco minutos, seguido pela leitura em citômetro. Este Kit além da contagem de células detecta a viabilidade celular possibilitando a estimativa de células apoptóticas e mortas por necrose.

As amostras foram analisadas utilizando o citômetro Guava easyCyte 8 - 10HT (Merck Millipore) e o Software Guava Cytosoft® (Merck Millipore), onde pelo menos 1000 eventos foram avaliados para cada amostra.

3.4.3 Análise Morfológica de morte celular

Para marcação por fluorescência, as células L6 foram incubadas com (a) iodeto de propídio (IP), numa diluição de 1:200 do estoque 5 mg/mL e incubadas durante 20 min à temperatura ambiente, e (b) Hoechst 33342, na mesma diluição do estoque de 10 mg/ml e por 10 min à temperatura ambiente.

As imagens foram adquiridas com uma máquina fotográfica acoplada ao microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E 400, equipado com o software de aquisição de ACT-1, utilizando uma objetiva de 40 X Nikon Plano Fluor®. As imagens foram visualizadas utilizando um filtro de rodamina (exitação a 530 - 560

nm / emissão a 580 nm) e um filtro de DAPI (exitação a 340-380 nm / emissão a 430 nm), respectivamente. As técnicas de coloração Hoechst e IP são empregadas para distinguir a morte celular apoptótica ou necrótica. Os núcleos em situações normais quando corados com Hoechst exibem tonalidade azul com estrutura organizada. Os núcleos apoptóticos apresentam tonalidade fluorescente azul brilhante em virtude da condensação ou fragmentação da cromatina. Entretanto, quando coradas com IP, composto fluorescente altamente hidrossolúvel e que, portanto, não ultrapassa membranas intactas, não se incorporando a células viáveis. Ele se liga a ácidos nucleicos intercalando-se entre as bases nitrogenadas permeando apenas células que não apresentam membrana integra (ENGELBRECHT et al.,2007).

Para avaliar necrose, seis campos escolhidos aleatoriamente, por placa, foram analisados. Dados expressos em valores de fluorescência média pela área. O índice de apoptose, ou porcentagem de células apoptóticas, foi calculado como número de células total dividido pelo número de células em apoptose, contadas em aumento de 100 X. A contagem foi feita às cegas.

3.5 Western Blot

Para a extração de proteínas celulares foi usada uma solução tampão de lise constituída por 20 mM Tris-acetato (pH 7,0), 0,27 M sacarose, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 50 mM NaF, 1% vol/vol Triton X-100, 5 mM pirofosfato de sódio, 10 mM glicerofosfato de sódio, 1 mM benzamidina, 1 mM ditiotreitol, 1mM Na₃VO₄, e 4 μ g/ml de leupeptina, conforme descrito por Tonnesen et al. (2009).

Após cada protocolo de incubações as células foram lavadas com PBS frio, transferidas para tubos *eppendorf*, lisadas em sonicador sob tampão de lise (100 μ L) e mantidas durante 30 min no mesmo tampão. O material insolúvel em detergente foi separado por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min, a 4 °C.

Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado, utilizando-se o método de Bradford (*BioRad*). As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1 M pH7,0, glicerol 50 %, SDS 20 %) contendo DTT 200 mM. Foram utilizados 20 a 50 μg de proteína total para eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, 6,5 à 15 % Tris acrilamida) com tampão de corrida constituído por Trisma base 0,2 M, glicina 0,152 M, EDTA 7,18 M, SDS 0,4 % e água deionizada).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, por 2 h a 120 V. Ao tampão contendo trisma base 25 mM, glicina 129 mM, metanol 20% foi acrescido SDS 0,1% para otimizar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Imediatamente após a transferência as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau e escaneadas para uso posterior como normalizador dos immunoblottings. Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com solução para reduzir a ligação inespecífica de anticorpos à membrana, por 2 h, a 4 °C, que continha caseína (leite desnatado Molico® 5%), Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02. Em seguida, as membranas foram incubadas com diferentes anticorpos, diluídos conforme orientação do fornecedor (1:200 a 1:1000) com solução contendo BSA 0,3 %, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02 %, por 12 h a 4 °C. Os anticorpos usados foram: anti-caspase 3, anti-caspase 3-clivada, anti-pSer473 AKT, anti-BiP, antipPERK, anti-p-eiF2α, anti-iNOS (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), anti-AKT, anti-PERK, anti-eiF2a, anti-ATF4, anti-CHOP, anti-GADD34 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).

Após o período da incubação com os anticorpos, as membranas foram lavadas com a mesma solução sem leite ou BSA por 30 min e incubadas com um anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, por 1 h em temperatura ambiente e, em seguida foi utilizada solução para detecção por quimiluminescência as bandas correspondentes às proteínas de interesse, como descrito no protocolo do kit comercial (ECLPlus, Amersham). A emissão de luz foi detectada e visualizada no sistema de captação de imagens *MF-Chemibis –Bio-Imaging System* (BioAmerica, EUA).

A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (*Scion Image Software MD, USA*). As bandas correspondentes as proteínas foram normalizadas pela densitometria das membranas coradas com vermelho de Ponceau, conforme proposto por Romero-Calvo et al. (2010).

3.6 Slot Blot

As células foram removidas da placa de cultivo e colocadas em microtubos de 500uL e posteriormente foram submetidas a homogeneização ultrassónica em tampão Tris-HCL 50 mM (Tris-HCL 50 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de PMSF) e centrifugadas a 12000 rpm por 15 min. Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado, utilizando-se o método de Bradford (BioRad), posteriormente as amostras foram devidamente diluídas. As amostras foram então transferidas (0,5 ug) para membrana de nitrocelulose através do sistema slot blot *Bio-Rad (Richmond, CA*) utilizando vácuo. As membranas foram coradas com solução de vermelho de ponceau e suas imagens scaneadas para verificar eficiência da transferência

O bloqueio de sítios inespecíficos presentes nas membranas de nitrocelulose foi realizado através da incubação das membranas com solução de caseína [0,2% em TBS-t (20 mM TRIS, 385 mM NaCl, 0.05% Tween 20)] por uma hora, sob agitação contínua.

Após este período as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti nitro-tirosina (1:1000) em TBS-t durante 16 h sob agitação contínua a 18 °C. As membranas foram lavadas com TBS-t e incubadas com anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:3000 em TBS-t por duas horas e posteriormente a quimiluminescência foi detectada como descrito no protocolo do kit comercial na seção anterior (ECLPlus, Amersham).

A emissão de luz foi detectada e visualizada no sistema de captação de imagens MF-Chemibis – Bio-Imaging System (BioAmerica, EUA).

A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (*Scion Image Software MD, USA*). As bandas representativas das proteínas foram normalizadas pela densitometria das membranas coradas com vermelho de Ponceau (SULTANA,R.; BUTTERFIELD D.A, 2008).

3.7 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste de uma via (ANOVA) com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer para (ANOVA), onde foram considerados valores siginificativos para p<0,05. Os resultados estão expressos como média± erro padrão da média (M ±EPM), sistematizados no programa Graph Pad Prism 6.0.

4 Resultados

4.1 Efeito citotóxico de Palmitato e DHEA sobre miotubos diferenciados

4.1.1 Determinação das concentrações a serem utilizadas de Palmitato e DHEA

Ao atingir 90% de confluência os mioblastos L6 mantidos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB foram tripsinizados e distribuídos em novas placas, no entanto, o meio de cultura foi restrito a 2 % de SFB. As células foram utilizadas após a diferenciação, a miotubos, durante 6 dias para as avaliações dos efeitos do ácido graxo e DHEA com meio isento de SBF e acrescido de 2 % de albumina, como descrito por Spector (1975).

Os miotubos diferenciados foram incubados com 3 diferentes concentrações de palmitato por 12 h consecutivas, 0,5 mM, 1 mM e 2 mMM, e subsequentemente foi realizada análise da viabilidade celular usando o corante azul de Trypan (figura 7).

À inspeção inicial de cada placa foi observado aumento de células não aderidas e formação de debris, induzindo aumento de turbidez no meio de cultura proporcional às doses de palmitato utilizada, indicando maior efeito tóxico quanto maior a concentração do ácido graxo.

A figura 7 representa a viabilidade celular em relação ao grupo controle. Foi detectado efeito dose dependente, com redução da viabilidade celular para 80 % \pm 4 % do controle nas amostras incubadas com 0,5 mM de palmitato, para 50 % \pm 11 % com 1 mM e para 15 % \pm 7 % com 2 mM. Foi escolhida a concentração de 0,5 mM de ácido palmítico para ser utilizada nos experimentos subsequentes como a dose capaz de induzir efeito citotóxico leve em comparação às demais.



Figura 7 - Efeito do palmitato na viabilidade celular dos miotubos L6 incubados com 0,5 mM, 1 mM e 2 mM por 12 h consecutivas. * Indica diferença em comparação ao grupo controle, • indica diferença em comparação ao grupo 0,5 mM e # indica diferença em comparação ao grupo 1 mM, p<0,05. O gráfico representa as médias ± o erro padrão, (n=4 experimentos independentes).

Em seguida, foi avaliada viabilidade celular dos miotubos incubadas em 3 três concentrações distintas de DHEA (10 nM, 100 nM e 10 uM) e por 2 períodos temporais diferentes (12 e 36h).

A figura 8 ilustra os dados obtidos com o método do Trypan. As concentrações de 10 nM e 100 mM não induziram qualquer modificação na viabilidade celular, por outro lado, a concentração farmacológica de DHEA 10 uM, em ambos os períodos de incubação, induziu redução de 10% da viabilidade celular. Diante disso, os experimentos subsequentes foram realizados utilizando a concentração de 10 nM, denominada a partir desse ponto como DHEA *low*, e a de 100mM como DHEA *high*.



Figura 8 - Efeito da incubação com 10 nM, 100 nM e 10 uM de DHEA por 12 h e 36 h consecutivas sobre a viabilidade celular dos miotubos L6 (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, p<0,05. O gráfico representa as médias ± o erro padrão.

A figura 9 confirma a ausência de efeito tóxico do DHEA nas concentrações 10 nM (DHEA *low*) e 100 nM (DHEA *high*) através tanto da citometria de fluxo (Fig 3^{A}) quanto pela avaliação morfológica nuclear como por microscopia de fluorescência (Fig 3B). De fato, foi detectado redução de núcleos apoptóticos corados com o fluoróforo Hoescht nas células incubadas com DHEA *low* para 40 % ± 4 % comparado aos controles e a DHEA *high* (Fig 9C).

O iodeto de propídio cora somente os núcleos de células necróticas (Figura 9B) e a quantificação desse efeito foi feito através da medida da intensidade de fluorescência nos campos analisados.

A figura 9D mostra graficamente a intensidade de células necróticas induzidas pela incubação com o esteroide. O DHEA, nas duas doses utilizadas, manteve a mesma proporção de células necróticas que o controle.



Figura 9 - Efeito do DHEA sobre a viabilidade celular, apoptose e necrose de miotubos L6. (**A**) Efeito da incubação com DHEA 10 nM (*low*) e DHEA 100 mM (*high*) por 12 h sobre a viabilidade celular dos miotubos L6 por citometria de fluxo (n=5). (**B**) Imagens representativas de microscopia de

fluorescência, em azul com o corante Hoescht e em vermelho o marcador lodeto de propídeo. (IP) (C) e (D) Representação gráfica dos dados da microscopia de fluorescência marcados com Hoechst à esquerda e PI à direita (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, p<0,05. Os gráficos representam as médias \pm o erro padrão.

4.1.2 Efeito do DHEA sobre a toxicidade induzida pelo palmitato

A incubação simultânea do DHEA e palmitato revelou efeito protetor do esteroide sobre o efeito pró-apoptótico do palmitato (Figura 10A) em qualquer uma das 2 doses utilizadas. DHEA *low* reduziu em 11 % \pm 3 %, p<0,05, e a DHEA *high* induziu redução de 7 % \pm 2 % no efeito do palmitato.

Ademais, utilizando a morfologia nuclear com o fluoróforo Hoechst foi possível determinar o aumento da presença de células apoptóticas para aproximadamente 130 % ± 10 % no grupo palmitato em comparação as células controles, p<0,05. O esteroide em baixa concentração incubado simultaneamente com o palmitato, DHEA low+Palm, impediu o efeito do palmitato. Por outro lado, e de modo inesperado, a concentração maior de DHEA incubada simultaneamente com o palmitato não interferiu com o efeito pró-apoptótico do palmitato (Figura 10C).

O iodeto de propídeo mostra que o palmitato induziu cerca de 9 vezes mais necrose celular em relação aos controles, de aproximadamente 0,2 a 1,7 unidades de fluorescência, p<0,05 (Figura 10D). Por outro lado, o DHEA incubado em qualquer uma das doses simultaneamente ao palmitato não foram capazes de modificar o efeito indutor de necrose do ácido graxo (Figura 10D).



Figura 10 - Efeito do DHEA sobre a toxicidade induzida pelo palmitato nos miotubos L6. (**A**) Efeito da incubação com palmitato, DHEA low+Palm e DHEA high+palm por 12 h sobre a viabilidade celular dos miotubos L6 por citometria de fluxo (n=5). (**B**) Imagens representativas da microscopia de fluorescência, em azul com o corante Hoescht e em vermelho com iodeto de propídeo (IP). (**C**) e (**D**)

Representação gráfica para microscopia de fluorescência marcados com Hoechst à esquerda e IP à direita (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, # Indica diferença em comparação ao grupo palmitato, p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.

4.2 Expressão e Nitração Proteica

4.2.1 Efeito do DHEA e Palmitato sobre a expressão protéica de caspase-3, caspase-3 clivada, AKT total e sobre o grau de fosforilação da AKT

A figura 11 apresenta imagens representativas dos *immunoblottings* com os anticorpos específicos para avaliação da expressão proteica da caspase-3, sua forma clivada, a AKT e a AKT fosforilada no resíduo serina 473 (Figura 11A).

O palmitato, como esperado, apresentou menor expressão da caspase-3 em relação aos controles e simultâneo aumento da forma clivada da caspase-3 de 17 kDa nos miotubos L6 (Figura 11A, painéis superiores). A razão caspase clivada pela caspase total foi 10 vezes maior nas células incubadas com o palmitato do que as controles (p<0,05) (Figura 11B).

Por outro lado, a menor dose de DHEA (*low*) induziu um aparente discreto aumento da expressão da caspase-3 total em comparação ao controle, sem correspondente modificação na sua forma clivada (Figura 11A). A razão caspase clivada pelo total foi semelhante entre os grupos DHEA e controle (Figura 11B).

A incubação simultânea de palmitato e DHEA resultou em interferência negativa sobre o efeito do palmitato, ou seja, induziu redução na expressão de caspase-3 clivada (Figura 11A). A razão caspase clivada pelo total foi de aproximadamente 40% do detectado com palmitato isoladamente. Esse efeito protetor do DHEA aconteceu independente da dose utilizada (Figura 11B).

Os tratamentos com palmitato ou DHEA isoladamente não interferiram com a expressão da AKT nos miotubos L6 (Figura 11A). No entanto, a incubação com anticorpo anti-fosfoserina 473 do AKT permitiu a detecção de aumento no grau de fosforilação dessa proteína com o DHEA low e a sua redução quando as células foram incubadas com palmitato, isolado ou associado ao DHEA (Figura 11A, painel inferior). A relação estequiométrica entre pSerAKT e AKT demonstra que o palmitato induziu redução para aproximadamente 60% do observado no controle (p<0,05) e que o DHEA em dose baixa (*low*) realmente induziu aumento da fosforilação para

140%±6%, p<0,05, em relação ao grupo controle. Por outro lado, a associação palmitato e DHEA não apresentou diferença na intensidade da fosforilação induzida pelo palmitato isolado. (Figura 11C).



Figura 11 - Efeito do DHEA e palmitato na expressão proteica de caspase-3 e AKT de miotubos L6. (**A**) Imagem representativa dos *immunoblotting* típicos para caspase-3, caspase-3-clivada, AKT total e p-AKT (fosfoserina 473, ser473). (**B**), Efeito do DHEA e palmitato na razão caspase-3 clivada/caspase-3 (**C**) e (**D**) Efeito da administração de DHEA e palmitato sobre a expressão proteica de caspase-3 e caspase-3 clivada e relação entre p-AKT e AKT total em miotubos L6 (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, # Indica diferença em comparação ao grupo palmitato, a significância considerada para p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.

4.2.2 Efeito do DHEA e Palmiato sobre a expressão protéica e grau de fosforilação de proteínas relacionadas a resposta do retículo endoplasmático ao estresse celular (ERE): BiP, p-PERK, PERK, p-eiF2α, eiF2α, ATF4, CHOP, GADD34.

A figura 12A exibe imagens dos *immunoblottings* com cada um dos anticorpos contra as proteínas Bip, PERK, eiF2α, ATF4, CHOP e GADD34 e contra as formas

fosforiladas p-PERK e p-eiF2α, à direita está uma membrana corada com Ponceau que foi utilizada para padronizar as leituras das intensidades de cada banda.

O tratamento com palmitato induziu aumento da expressão da proteína Bip para cerca do dobro do detectado no controle, p<0,05 (Figura 12B), confirmando o efeito modulador desse ácido graxo sobre a via do ERE. O DHEA isoladamente não diferiu dos controles, por outro lado a incubação com o esteroide simultânea ao palmitato foi capaz de interferir no efeito do ácido graxo, nas duas doses utilizadas (Fig 12B).

A expressão das proteínas PERK e eiF2 α não apresentaram diferenças nas distintas condições experimentais, por outro lado a intensidade da fosforilação de cada uma dessas proteínas foi modificada pelo palmitato e pela associação com o DHEA. A Figura 12C mostra que o palmitato induziu aumento da fosforilação da PERK (p-PERK) para 151 % ± 4% do controle (p<0,05) e o uso do DHEA simultâneo interferiu no aumento, resultando em valor aproximado de 120 % do controle (p<0,05) e aproximadamente 80 % do detectado com o palmitato (p<0,05), independentemente da dose utilizada.

A figura 12D mostra o aumento da intensidade da fosforilação da eiF2 α (peiF2 α) induzida pelo palmitato cerca de 60 % acima do observado na condição controle (p<0,05) e a incubação com DHEA, em ambas concentrações, reduziu o efeito isolado do palmitato em 26 % ± 6 % (p<0,05).

A proteína ATF4, um fator de transcrição que intermedeia a resposta do ER ao estresse, sofreu efeito negativo da incubação com o palmitato. Foi detectado redução para aproximadamente 50% do controle (p<0,05). O uso simultâneo de DHEA não interferiu nesse efeito, mantendo aproximadamente 50 % de redução da expressão da ATF4 nas células incubadas com palmitato e DHEA em ambas concentrações (Figura 12E).

A jusante ao ATF-4 está a proteína CHOP e sua expressão está representada graficamente na figura 12F. O palmitato induziu o aumento para 243 % \pm 5 %, p<0,05, quando comparado ao controle. A incubação simultânea com DHEA em dose baixa (low) reduziu o aumento para 135 % \pm 3 % do controle (p<0,05) e a dose alta (DHEA *high*) foi capaz de manter a mesma proporção que o controle.

A proteína GADD34 apresentou-se aumentada pelo DHEA em dose alta para cerca de 40 % a mais do que o controle (p<0,05). Além disso, o palmitato foi capaz de reduzir sua expressão para 34 % \pm 5 % em relação ao controle (p<0,05). A associação do ácido graxo e DHEA resultou em efeitos diferentes: DHEA baixa concentração (*low*) não interferiu com o efeito do palmitato, porém o uso da dose alta (DHEA *high*) impediu o efeito do palmitato isoladamente (Figura 12G).





Figura 12 - Efeito do DHEA e palmitato sobre a expressão protéica e grau de fosforilação de proteínas relacionadas a resposta do reticulo endoplasmático ao estresse celular (ERE. (**A**) Imagem representativa dos *immunoblotting* típicos para Bip, p-PERK, PERK, p-eiFa α , eiF2 α , ATF4, CHOP, GADD34. Representação gráfica do efeito do DHEA e palmitato sobre a expressão proteica de Bip (**B**), da razão p-PERK e PERK (**C**), da razão p-eiFa α e eiF2 α (**D**), da expressão do ATF4 (**E**), da expressão proteica de CHOP (**F**) e da expressão de GADD34 (**G**) em miotubos L6 (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, # Indica diferença em comparação ao grupo palmitato, a significância considerada para p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.

4.2.3 Efeito do palmitato e do DHEA sobre a nitração de proteínas celulares e sobre a expressão proteica de iNOS

A nitração de proteínas foi mensurada através da presença de proteínas contendo resíduos de 3-nitrotirosina pelo método de *slot blot,* após incubação com palmitato e ou DHEA nas duas concentrações por 1, 3, 6 e 12 h (Figura 13). A análise de imagens semelhantes a apresentada com Figura 6A permitiu construção de um gráfico do decurso temporal da indução de nitração (Figura 13B).

As células expostas ao meio de cultura pelo período de 12 h não apresentam modificação de seu conteúdo de proteínas nitradas ao longo do tempo. Por outro lado, o palmitato induziu aumento da nitração proteica a partir de 6 h de incubação e se manteve mais elevado que os demais grupos até o final do protocolo (Figura 13B). A análise da área sob a curva mostra que o palmitato induz aumento de 2 vezes do conteúdo de proteínas nitradas em relação ao controle. O DHEA isoladamente apresentou um padrão semelhante ao controle, ou seja, não induziu modificação na nitração das proteínas celulares e, de modo, claro o uso concomitante de DHEA e palmitato, em qualquer uma das doses usadas, impediu o efeito indutor da nitração das proteínas celulares (Figura 13C).

A expressão proteica da NOS induzível, iNOS, foi avaliada por *immunoblotting* (Figura 13D, painel superior). A análise da densitometria óptica confirmou que o palmitato induziu aumento da expressão da iNOS para 214 % \pm 5 %, p<0,05, em comparação ao controle. Além disso, a incubação simultânea com DHEA, nas duas doses, foi capaz de impedir o efeito do palmitato, mantendo a expressão da iNOS na mesma magnitude das células controle Fig 13D).



Figura 13 - Efeito do palmitato e do DHEA sobre a nitração de proteínas celulares e sobre a expressão proteica de iNOS. (A) Imagem representativa do slot blot para proteinas nitradas. (B) Decurso temporal da nitração de proteínas celulares após 1, 3, 6 e 12 h de incubação com DHEA e palmitato em miotubos L6 (n=3). (C) Área total sob a curva do decurso temporal de nitração de proteinas. (D) Efeito da administração de DHEA e palmitato sobre a expressão proteica de iNOS,(n=4).* Indica diferença em comparação ao grupo controle, p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.

5 Discussão

Neste estudo foi utilizado um modelo celular de citotoxicidade induzida pelo palmitato a 0,5 mM para avaliar os possíveis efeitos do esteroide DHEA em duas diferentes concentrações, a menor (10 nM) que se aproxima ao detectado na situação fisiológica e a maior que representa condição supra-fisiológica ou mesmo patológica em excesso de androgênios como observado na síndrome de ovários policisticos (100 nM).

Nos últimos anos diversos efeitos benéficos desse esteroide foram verificados em modelos animais e cultivo celular como, antiobesidade (HANSEN et al., 1997), efeito antidiabetogênico devido ao aumento da sensibilidade à insulina (CAMPBELL et al., 2004; RICHARDS, PORTER; SVEC, 2000), prevenção na disfunção endotelial, redução na pressão arteial (CAMPOREZ et al., 2011) além de estudos in vitro demonstrarem redução do número de células apoptótica e aumento da proliferação em células endoteliais (LIU et al., 2007).

Os resultados obtidos indicaram que concentração fisiológica do esteroide (DHEA low, 10 nM) induz maior percentual de miotubos viáveis em relação aos tratados apenas com veículo (Controle). Além disso, em ambas as concentrações (10 nM e 100 nM) o DHEA foi capaz de reduzir o dano causado pela citotoxicidade do ácido graxo.

Ademais, quando avaliamos a morfologia dos núcleos apoptóticos marcados com Hoechst, surpreendentemente, apenas a dose baixa de DHEA foi capaz de reduzir a apoptose e também impedir a fração induzida pelo palmitato. Isso demonstrou que o efeito do aumento da viabilidade é reflexo da ação específica do esteroide sobre a apoptose.

Esse efeito protetor do DHEA contra a apoptose foi demonstrado em outro tipo celular, cultura primária de células de Leydig, com estímulo pró-apoptótico de H₂O₂. O mecanismo envolvido nesse efeito foi redução da expressão gênica de caspase-3 e atenuação do dano causado ao DNA induzido por H₂O₂ (XIAO et al., 2017). Da mesma maneira a incubação de ovócitos de humanos inaptos a fertilização após incubação com DHEA apresentaram a redução de apoptose,

redução da expressão gênica de caspase-3, além da melhora da função mitocondrial (LIN et al., 2017).

De modo semelhante aos estudos recentemente publicados, os dados obtidos de redução da apoptose nos miotubos pela incubação simultânea com o estressor e o esteroide, palmitato e DHEA respectivamente, envolveu a diminuição da razão entre as formas da caspase-3, total e clivada.

Outra proteína com função crítica na regulação da sobrevivência celular e proliferação é a AKT/PKB. Essa proteína apresenta atividade serina/treonina quinase e, semelhante a outras proteínas com atividade quinase, possui 3 domínios principais: domínio *plecstrin*, o domínio central quinase e um terminal carboxila que permite interação com outras moléculas de sinalização. A AKT/PKB desempenha papel importante em várias vias intracelulares ligando estímulos extracelulares a regulação de funções que incluem metabolismo de nutrientes, crescimento celular, apoptose e sobrevivência, inclusive no tecido muscular esquelético (HIRSCH et al.,2007).

A relação estequiométrica entre grau de fosforilação e conteúdo proteico da AKT, razão p-AKT^{ser473} e AKT total, permitiu detectar aumento da intensidade de fosforilação da AKT induzida pelo DHEA em concentração fisiológica (10nM). Além disso, confirmou redução dessa fosforilação devido à exposição ao palmitato. No entanto, a ausência de efeito do DHEA quanto incubado simultaneamente com o agente estressor, parece indicar que o efeito anti-apoptótico do DHEA tenha sido devido à modificação na via da caspase-3 e não pela mediada pela AKT/PKB.

Desregulação do processo apoptótico está envolvido na fisiopatologia de diversas enfermidades, como doenças degenerativas, autoimunes e tumorais (FALAVORO et al, 2012; FULDA et al, 2012). Contudo uma resposta celular que tem sido implicada com o processo de apoptose é a do reticulo endoplasmático (RE) ao estresse celular induzido por situações como excessiva síntese de proteínas e consequente acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen dessa organela, hiperglicemia ou excesso de ácidos graxos.

O presente estudo avaliou a resposta do RE ao estresse induzido pelo palmitato e o efeito do DHEA. Em linhas gerais, a resposta de estresse do RE envolve a ativação de 3 proteínas localizadas na membrana dessa organela

Inúmeras evidencias demonstram que ácidos graxos específicos são capazes de desencadear apoptose em células β-pancreáticas através da resposta ao estresse de RE (CUNHA et al., 2008). De fato, Cunha e colaboradores, identificaram ativação da via PERK/eIF2a naquele tipo celular e aumento da expressão da proteína CHOP.

Resultado semelhante foi observado com os miotubos incubados com palmitato, indicando que esse ácido graxo, na concentração aqui usada foi capaz de induzir estresse do RE.

Aliás, está bem estabelecido que quando a proteína PERK é ativada, além de se autofosforilar, ela implementa sua capacidade quinase em direção à proteína eIF2a, uma proteína que tem papel central na iniciação da tradução a partir de RNAm.

Assim, a fosforilação dessa molécula iniciadora da tradução resulta em modulação do processo de tradução: alguns RNAm são inibidos, e consequentemente há inibição da produção de novas proteínas, outros RNAm são preferencialmente induzidos à tradução, como o fator de transcrição ATF4. O ATF4, por sua vez, regula a expressão de genes envolvidos com transporte de aminoácidos, síntese de glutationa, resistência ao estresse oxidativo e a proteína CHOP.

Desta maneira, esse fator de transcrição tem um papel importante na proteção das células dos efeitos deletérios de oxidantes. Por outro lado, um recente estudo demonstrou que a incubação de fibroblastos embrionários de rato na presença de tapsigargina ou ciclo-hexamida promoveu o aumento do estresse de RE mediado pela ativação da via PERK/eiF2a consequentemente aumentando a expressão de RNAm de CHOP, independentemente da ativação de ATF4 (CHAN et al., 2017). Em adição a supressão de ATF4 utilizando siATF4 em células condrogênicas resultou redução do crescimento de condrócitos, além de aumentar a apoptose induzida por estresse de RE durante a condrogenese (WU et al., 2017). Tais dados sugerem que os mecanismos pelo qual o estresse de reticulo regula a expressão de ATF4 ainda são desconhecidos. Por outro lado, a CHOP promove apoptose quando há resposta de estresse do RE sustentada. O efeito sustentado da CHOP envolve *upregulation* da subunidade reguladora 15A da proteína fosfatase 1, conhecida como GADD34. A GADD34 atua reduzindo o efeito inibitório sobre a

síntese proteica iniciada com a via PERK/eIF2a. Embora esse efeito permissivo para reiniciar síntese proteínas novas, também promove aumento celular de produtos oxidantes devido a síntese proteica e apoptose (revisado NAVID; COLBERT, 2012).

O DHEA isoladamente na maior concentração usada foi capaz de aumentar a expressão da GADD34, mas sem ter induzido aumento nos demais elementos dessa via PER/eIF2a/ATF4. Por outro lado, o uso simultâneo desse esteroide com palmitato, foi capaz de impedir ativação da via PERK/eIF2a nos miotubos.

Um dos principais componentes da via de apoptose mediada pelo estresse ER é proteína CHOP, que uma vez aumentada desencadeia mecanismos de morte celular (RON 2002). O DHEA foi capaz de impedir o aumento da expressão de CHOP induzido por palmitato, portanto, interferindo diretamente na via de apoptose mediada pelo estresse de RE.

Ainda são desconhecidos os mecanismos que desencadeiam o estresse ER nas células musculares. No entanto, há estudos que mostraram interações físicas e bioquímicas entre RE e mitocôndrias. Há ligação física através de regiões membranares do ER associadas à mitocôndria (MAM) (CSORDAS; HAJNOCZKY, 2009). Além disso, ions cálcio e ROS são moléculas chaves envolvidas na comunicação entre essas duas organelas, além de ter sido identificada uma correlação entre o acúmulo de ROS e estresse de RE (HARDING et al., 2003). Mais específicamente, Xue et al.(2005), demonstraram que o acúmulo de ROS induzido por TNF-α promove o acréscimo da produção de UPR (*unfolded protein response*) em células de fibrosarcoma.

Evidencias anteriores demonstraram que palmitato induz ROS em miotubos L6 e aumento da expressão da sintase induzível de óxido nítrico (iNOS), além de degeneração do DNA mitocondrial (RACHEK et al., 2007), bem como em células musculares esqueléticas (LAMBERTUCCI et al., 2012).

No presente estudo, o palmitato induziu aumento precoce da nitração de proteínas celulares, e o uso do DHEA, em ambas as concentrações, impediu esse efeito. Essa resposta foi acompanhada por aumento da iNOS induzida pelo palmitato e impedimento desse aumento com o esteroide associado ao ácido graxo. Aliás, redução de iNOS por suplementação com DHEA foi também detectado em corações de ratos envelhecidos (YIN et al, 2015).

6 Conclusão

O DHEA em concentração fisiológica, 10nmM, apresenta efeito protetor contra a apoptose e modula a expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose em miotubos L6, caspase 3 e AKT. Além disso, esse esteroide impede os efeitos pro-apoptóticos do palmitato tanto em concentração fisiológica (10 nM) quanto em suprafisiológica (100 mM).

O DHEA, em ambas as concentrações, reduz o estresse de RE induzido por ácido palmítico através de modulação da via PERK/eIF2α/CHOP.

O DHEA tem efeito antioxidante mediado por regulação da expressão da iNOS em miotubos L6 incubados com palmitato.

Em conclusão, os dados obtidos nos permitem concluir que o DHEA apresenta efeitos protetores contra a citotoxicidade induzida por palmitato.



Figura 14 - Esquema proposto para a ação do DHEA sobre a citotoxicidade induzida por palmitato em miotubos L6

REFERÊNCIAS*

ABDULKARIM B, HERNANGOMEZ M, IGOILLO-ESTEVE M, CUNHA DA, MARSELLI L, MARCHETTI P, LADRIERE L, CNOP M. Guanabenz Sensitizes Pancreatic β Cells to Lipotoxic Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis. **Endocrinology**, v.158, n.6, p.1659-1670, 2017.

AIZAWA K.; IEMITSU M.; MAEDA, S.; JESMIN, S.; OTSUKI T.; MOWA C.N.; MIYAUCHI T., MESAKI, N. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 292, n.2, p.577-584, 2006.

ARAGNO M.; MASTROCOLA R.; CATALANO M.G.; BRIGNARDELLO E.; DANNI O.; BOCCUZZI G. Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. **Diabetes**, v. 53, n.4, p.1082-1088, 2004.

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

BAKKER SJ, IJZERMAN RG, TEERLINK T, WESTERHOFF HV, GANS RO, HEINE RJ. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and-cell failure? **Atherosclerosis**, v.148, p.17–21, 2000.

BRAAKMAN I, HEBERT DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.5, n.5, p.12-15, 2013.

BREHM A.; KRSSAK M.; SCHMID AI.; NOWOTNY P.; WALDHÄUSL W.; RODEN M. Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 55, n.1, p.136-140, 2006.

BREHM A.; KRSSAK M.; SCHMID AI.; NOWOTNY P.; WALDHÄUSL W.; RODEN M. Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 55, n.1, p.136-140, 2006.

BRAVO R, VICENCIO JM, PARRA V, TRONCOSO R, MUNOZ JP, BUI M, QUIROGA C, RODRIGUEZ AE, VERDEJO HE, FERREIRA J, IGLEWSKI M, CHIONG M, SIMMEN T, ZORZANO A, HILL JA, ROTHERMEL BA, SZABADKAI G, LAVANDERO S. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. **J Cell Sci**, v.1, n.124, p.2143-2152, 2011.

BROWN, R.C.; HAN Z.; CASCIO C.; Papadopoulos V. Oxidative stress-mediated

^{*} De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

DHEA formation in Alzheimer's disease pathology. **Neurobiol Aging**, v. 24, n.1, p.57-65, 2003.

CAMPBELL C.S.; CAPERUTO L.C.; HIRATA A.E.; ARAUJO E.P.; VELLOSO L.A.; SAAD MJ.; CARVALHO C.R. 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**, v.76, n.1, p.57-70, 2004.

CECI R; DURANTI G.; ROSSI A.; SAVINI I.; SABATINI S. Skeletal Muscle Diff erentiation: Role of Dehydroepiandrosterone Sulfate. **Horm Metab Res**; v.43, p.702–707, 2011.

CHAN SMH, ZHAO X, ELFOWIRIS A, RATNAM C, HERBERT TP The role of de novo protein synthesis and SIRT1 in ER stress-induced Atf4 and Chop mRNA expression in mammalian cells. **Biochimie**, v.5, p.21-24, 2017.

COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and cancer. Nature, v. 420, p. 860-867. 2002.

CUNHA DA, HEKERMAN P, LADRIÈRE L, BAZARRA-CASTRO A, ORTIS F, WAKEHAM MC, MOORE F, RASSCHAERT J, CARDOZO AK, BELLOMO E, OVERBERGH L, MATHIEU C, LUPI R, HAI T, HERCHUELZ A, MARCHETTI P, RUTTER GA, EIZIRIK DL, CNOP M. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. **J Cell Sci**, v.121, n.14, p.2308-2318, 2008.

CSORDAS, G. HAJNOCZKY. SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. **Biochim. Biophys. Acta,** v.1787, p.1352–1362, 2009.

DELDICQUE L.; CANI P D.; PHILP A.; RAYMACKERS J M.; MEAKINP J.; ASHFORD M.; DELZENNE N M.; FRANCAUX M.; BAAR K. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 299, p. 695-705, 2010.

DILLON JS1, YANEY GC, ZHOU Y, VOILLEY N, BOWEN S, CHIPKIN S, BLISS CR, SCHULTZ V, SCHUIT FC, PRENTKI M, WAXMAN DJ, CORKEY BE. Dehydroepiandrosterone sulfate and beta-cell function: enhanced glucose-induced insulin secretion and altered gene expression in rodent pancreatic beta-cells. **Diabetes**, v. 49, n.12, p.2012-2020, 2000.

EIZIRIK DL.; CARDOZO AK.; CNOP M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. **Endocr Rev**, v.29, n.1, p.42-61, 2008.

EVANS JL.; GOLDFINE ID.; MADDUX BA.; GRODSKY GM. Are oxidative stressactivated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? **Diabetes**, v.52, n.1, p.1-8, 2003.

FAVALORO B, ALLOCATI N, GRAZIANO V, DI ILIO C, DE LAURENZI V. Role of **Apoptosis in disease**, v.4, n.5, p.330-349, 2012.

FULDA S, VUCIC D. TARGETING I. A proteins for therapeutic intervention in cancer. **Nat Rev Drug Discov,** v.11, n.2, p.109-124, 2012.

GORDON G.; MACKOW MC.; LEVY HR. On the mechanism of interaction of steroids with human glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Arch Biochem Biophys**, v.318, n.1, p.25-29, 1995.

GUMUCIO JP1, MENDIAS CL. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. **Endocrine**, v. 43, n.1, p.12-21, 2013.

HANSEN PA.; HAN DH.; NOLTE LA.; CHEN M.; HOLLOSZY JO. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **Am J Physiol**, v.273, n.5, p. 1704-1708, 1997.

HARDING, H. P., ZHANG, Y., ZENG, H., NOVOA, I., LU, P. D., CALFON, M., SADRI, N., YUN, C., POPKO, B., PAULES, R., STOJDL, D. F., BELL, J. C., HETTMANN, T., LEIDEN, J. M., RON, D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Mol. Cell**, v.11, p. 619–633, 2003.

HENNIG B, MEERARANI P, RAMADASS P, WATKINS BA, TOBOREK M. Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. **Metabolism,** v. 49, p.1006 – 1101, 2000.

HOEHN KL, HOHNEN-BEHRENS C, CEDERBERG A, WU LE, TURNER N, YUASA T, EBINA Y, JAMES DE. IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance. **Cell Metab**, v. 7, n.5, p.421-433. 2008.

HOUSTIS N, ROSEN ED, LANDER ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 13 n. 440, p.944-948, 2006.

HUNNICUTT JW1, HARDY RW, WILLIFORD J, MCDONALD JM. Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. **Diabetes**. v.43, n.4, p.540-545, 1994.

ISCHIROPOULOS H, BECKMAN JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? **J Clin Invest**, v.111, n.2, p.163-169, 2003.

JONATHAN W. MUELLER, LORNA C. GILLIGAN, JAN IDKOWIAK, WIEBKE ARLT, AND PAUL A. FOSTER. The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation. **Endocr Rev,** v. 36, n.5, p.526–563, 2015.

KAUFMAN RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. J **Clin Invest**, v.110, n.10, p.1389-1398, 2002.

KELLEY DE, GOODPASTER B, WING RR, SIMONEAU JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **Am J Physiol**, v. 277, n.6, p.1130-1141, 1999.

KELLEY DE, GOODPASTER BH, STORLIEN L. Muscle triglyceride and insulin resistance. **Annu Rev Nutr**, v. 22, p.325-346, 2002.

KELLEY DE, MANDARINO LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. **Diabetes**, v.49, n.5, p.677-683, 2000.

KELLEY DE, HE J, MENSHIKOVA EV, RITOV VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v,51, p.2944 –2950, 2002.

KNUTTI D, KRESSLER D, KRALLI A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 14, n.98, p.9713-9718, 2001.

LABRIE F, LUU-THE V, BÉLANGER A, LIN SX, SIMARD J, PELLETIER G, LABRIE C. Is dehydroepiandrosterone a hormone? **J Endocrinol**. v.187, n.2, p.169-196, 2005.

LAMBERTUCCI RH, HIRABARA SM, SILVEIRA LDOS R, LEVADA-PIRES AC, CURI R, PITHON-CURI TC. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. **J Cell Physiol**, v.216, n.3, p.796-804, 2008.

LEVIN K, DAA SCHROEDER H, ALFORD FP, BECK-NIELSEN H. Morphometric documentation of abnormal intramyocellular fat storage and reduced glycogen in obese patients with Type II diabetes. **Diabetologia**, v.44, n.7, p.824-833, 2001.

REYNOLDS KA, W, LIU D, SI Η. ZHEN JIA Ζ. DILLON JS. protects vascular endothelial cells against apoptosis Dehydroepiandrosterone through a Galphai protein-dependent activation of phosphatidy linositol 3kinase/Akt regulation of antiapoptotic Bcl-2 and expression. Endocrinology, v.148, n. 7, p.3068-3076, 2007.

MADARO L, MARROCCO V, CARNIO S, SANDRI M, BOUCHÉ M. Intracellular signaling in ER stress-induced autophagy in skeletal muscle cells. **FASEB J**, v.27, n.5, p.1990-2000, 2013.

MARCINIAK SJ, GARCIA-BONILLA L, HU J, HARDING HP, RON D. Activationdependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. **J Cell Biol**, v.16, n. 172, p.201-209, 2006.

MARLETTA MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v.78, n.6, p.927-930, 1994.

MEDINA MC, SOUZA LC, CAPERUTO LC, ANHÊ GF, AMANSO AM, TEIXEIRA VP, BORDIN S, CARPINELLI AR, BRITTO LR, BARBIERI RL, BORELLA MI, CARVALHO CR. Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. **FEBS Lett**, v.580, n.1, p.285-290, 2005. MITSUMOTO Y, KLIP A. Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. **J Biol Chem**, v.5, n.7, p.4957-4962, 1992.

MORIN C, ZINI R, SIMON N, TILLEMENT JP. Dehydroepiandrosterone and alphaestradiol limit the functional alterations of rat brain mitochondria submitted to different experimental stresses. **Neuroscience**, v.115, n.2, p.415-424, 2002.

NAVID, F; COBERT, R.A. Causes and consequences of endoplasmic reticulum stress in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v.13, p.25–40, 2017.

ORENTREICH N, BRIND JL, RIZER RL, VOGELMAN JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. **J Clin Endocrinol Metab**, v.59, n.3, p.551-555, 1984.

PARKER CR JR. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. **Steroids**, v.64, n.9, p.640-647, 1999.

PETER A, WEIGERT C, STAIGER H, MACHICAO F, SCHICK F, MACHANN J, STEFAN N, THAMER C, HARING HU, SCHLEICHER E. Individual stearoyl-coa desaturase 1 (SCD1) expression modulates er stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity in vivo. **Diabetes**, v.58, p.1757–1765, 2009.

PETERS JM, ZHOU YC, RAM PA, LEE SS, GONZALEZ FJ, WAXMAN DJ. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha required for gene induction by dehydroepiandrosterone-3 beta-sulfate. **Mol Pharmacol**, v.50, n.1, p.67-77, 1996.

PETERSEN KF, SHULMAN GI. Etiology of insulin resistance. **Am J Med,** v.119, n.5, p.10-16, 2006.

PIERRE N, DELDICQUE L, BARBÉ C, NASLAIN D, CANI PD, FRANCAUX M. Tolllike receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. **PLoS One**, v.31, n.5, p.6501-6505, 2013.

RACHEK LI, MUSIYENKO SI, LEDOUX SP, WILSON GL. Palmitate induced mitochondrial deoxyribonucleic acid damage and apoptosis in I6 rat skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v.148, n.1, p.293-299, 2007.

REID DW, NICCHITTA CV. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.16, n.4, p.221–231, 2015.

RICHARDS RJ, PORTER JR, SVEC F. Serum leptin, lipids, free fatty acids, and fat pads in long-term dehydroepiandrosterone-treated Zucker rats. Proc Soc **Exp Biol Med**, v.223, n.3, p.258-262, 2000.

ROMERO-CALVO I, OCÓN B, MARTÍNEZ-MOYA P, SUÁREZ MD, ZARZUELO A, MARTÍNEZ-AUGUSTIN O, ET AL. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal. Biochem**, v.401, n.2, p.318–320, 2010.

ROTH GS, LANE MA, INGRAM DK, MATTISON JA, ELAHI D, TOBIN JD, MULLER D, METTER EJ. Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. **Science**, v.2, n.297, p.5582-5811, 2002.

RUGGIANO A, FORESTI O, CARVALHO P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. **J Cell Biol**, v.204, n.6, p.869-879, 2014.

RYU JW, KIM MS, KIM CH, SONG KH, PARK JY, LEE JD, KIM JB, LEE KU. DHEA administration increases brown fat uncoupling protein 1 levels in obese OLETF rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v.4, n.303, p.726-731, 2003.

SCHWARTZ AG, PASHKO LL. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. **Ageing Res Rev**, v.3, n. 2, p. 171-187, 2004.

SCHWARTZ AG, PASHKO LL. Cancer chemoprevention with the adrenocortical steroid dehydroepiandrosterone and structural analogs. **J Cell Biochem Suppl**, v.17, p.73-79, 1993.

SCHWARZ DS, BLOWER MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cell Mol Life Sci**, v.73, n.1, p.79-94, 2016. doi: 10.1007/s00018-015-2052-6

SMITH AG, MUSCAT GE. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n.10, p.2047-2063, 2005.

SHANTZ LM, TALALAY P, GORDON GB. Mechanism of inhibition of growth of 3T3-L1 fibroblasts and their differentiation to adipocytes by dehydroepiandrosterone and related steroids: role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.86, n.10, p.3852-3856, 1989.

STUMP CS, HENRIKSEN EJ, WEI Y, SOWERS JR. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. **Ann Med**, v.38, n.6, p.389-402, 2006.

STUMP CS, SHORT KR, BIGELOW ML, SCHIMKE JM, NAIR KS. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, n.13, p.7996-8001, 2003.

TOBOREK M, HENNIG B. Fatty acid-mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. **Am J Clin Nutr**, v.59, p.60 – 65, 1994.

TONNESEN MF, GRUNNET LG, FRIBERG J, CARDOZO AK, BILLESTRUP N, EIZIRIK DL, STØRLING J, MANDRUP-POULSEN T. Inhibition of nuclear factorkappaB or Bax prevents endoplasmic reticulum stress- but not nitric oxide-mediated apoptosis in INS-1E cells. **Endocrinology**, v.150, n.9, p. 4094-4103, 2009.

VAZEILLE E, CODRAN A, CLAUSTRE A, AVEROUS J, LISTRAT A, BÉCHET D, TAILLANDIER D, DARDEVET D, ATTAIX D, COMBARET L. The ubiquitinproteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.295, n.5, p.1181-1190, 2008.

VELASCO G. Endoplasmic reticulum stressed by pollution. Focus on "Airborne particulate matter selectively activates endoplasmic reticulum stress response in the lung and liver tissues". **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 299, n.4, p.727-728, 2010.

WEIGERT C, BRODBECK K, STAIGER H, KAUSCH C, MACHICAO F, HÄRING HU, SCHLEICHER ED. Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. **J Biol Chem**, v. 4, n. 279, p. 23942-23952, 2004

WU Z, LI M, ZHENG W, HU Q, CHENG Z, GUO F. Silencing of both ATF4 and PERK inhibits cell cycle progression and promotes the apoptosis of differentiating chondrocytes **Int J Mol Med**, v. 3, n. 9, p. 32-39, 2017

XIAO D, LEI YU, CHONGYANG GE, HAITIAN MA. Protective effect of DHEA on hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in primary rat Leydig cells, **Oncotarge**t, v.8, n.10), p.16158-16169, 2017.

XUE, J.H. PIAO, A. NAKAJIMA, S. SAKON-KOMAZAWA, Y. KOJIMA, K. MORI, H. YAGITA, K. OKUMURA, H. HARDING, H. NAKANO Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. J. Biol. Chem., 280, pp. 33917–33925, 2005.

YIN FJ, KANG J, HAN NN1, MA HT.Effect of dehydroepiandrosterone treatment on hormone levels and antioxidant parameters in aged rats. **Genet Mol Res**. v.14, n.3, p.11300-11311, 2015.

ZHANG L, LI BS, MA W, BARKER JL, CHANG YH, ZHAO W, RUBINOW DR. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. **Brain Res Mol Brain Res**, v.98, n.1-2, p.58-66, 2002.

APENDICES



A - Efeito do DHEA sobre a apoptose e necrose nos miotubos L6. As células foram submetidas a incubação com DHEA low DHEA high e DHEA 10 uM por 36 h e12 h. (**A**) Imagens representativas da microscopia de fluorescência, em azul com o corante Hoescht e em vermelho com iodeto de propídeo (IP). (**B**) e (**C**) Representação gráfica dos dados da microscopia de fluorescência marcados com Hoechst à esquerda e PI à direita (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão



B - Efeito do DHEA sobre a apoptose e necrose induzida pelo palmitato nos miotubos L6. As células, foram submetidos a incubação com palmitato 12 h, de DHEA low + Palm , DHEA high + Palm e DHEA 10 uM + Palm por 36 h e12 h. (**A**) Imagens representativas da microscopia de fluorescência, em azul com o corante Hoescht e em vermelho com iodeto de propídeo (IP). (**B**) e (**C**) Representação gráfica dos dados da microscopia de fluorescência marcados com Hoechst à esquerda e PI à direita (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão



C - Efeito do DHEA e palmitato sobre a expressão protéica de proteínas relacionadas a via de síntese Proteica. Representação gráfica do efeito da incubação por 36h de DHEA nas concentrações 10 nM e 100 nM e palmitato 0,5 mM por 12 h sobre a expressão proteica de Akt , mTor ,p70s6k (**A**) , (**B**) Imagem representativa dos *immunoblotting* típicos para Akt, mTORC1, p70s6k (**C**), Representação gráfica do efeito da incubação por 12 h de DHEA nas concentrações 10 nM (DHEA low) e 100nM (DHEA high) e palmitato sobre a expressão proteica de Akt , mTor ,p70s6k (**D**), Imagem representativa dos *immunoblotting* típicos para Akt, mTORC1, p70s6k (**D**), Imagem representativa dos *immunoblotting* típicos para Akt, mTORC1, p70s6k em miotubos L6 (n=4). * Indica diferença em comparação ao grupo controle, # Indica diferença em comparação ao grupo palmitato, a significância considerada para p<0,05. Os gráficos representam as médias ± o erro padrão.