

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

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 desidroepiandrosterona (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/eif2 α /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 supra-fisiológicas 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 palmitate-induced 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.

Dehydroepiandrosterone (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/eif2 α /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. Reticule Stress

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;).

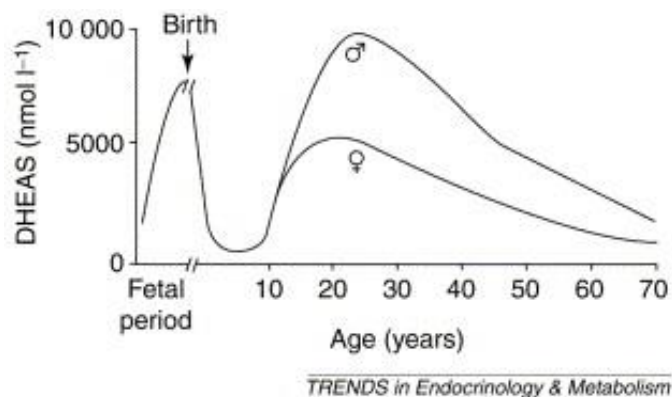


Figura1 - Concentração de DHEAS em humanos ao longo da vida (Willian et al., 2002)

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. Evidências 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 estradiol 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, sugeriram 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 esteroideogênicas. 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 glutathione (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 concentração 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 atuam 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 dissulfeto (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 UPR 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 lúmen 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 UPR 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).

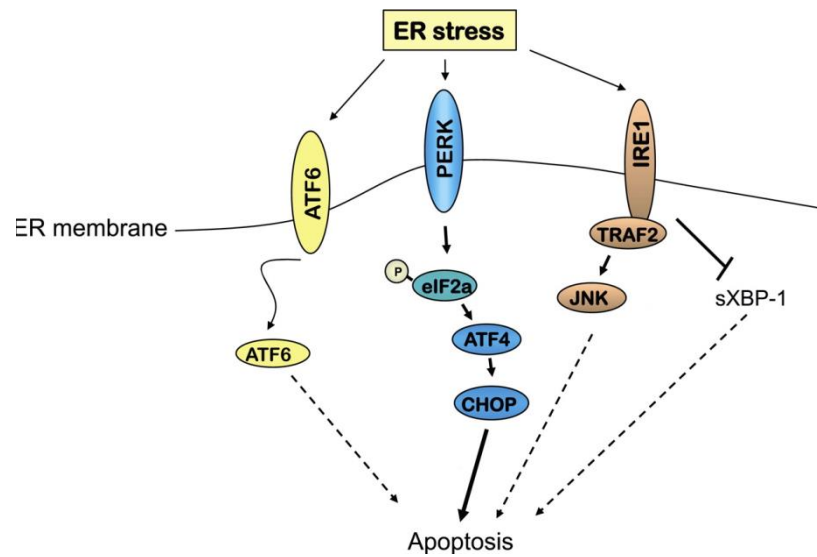


Figura 2 - Esquema da ativação das proteínas localizadas na membrana do RER ativadas em resposta ao estresse de retículo. **ATF6** – fator ativador de transcrição 6; **PERK** - protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase); **eIF2α** - Eukaryotic Initiation Factor; **ATF4** - fator ativador de transcrição 4; **CHOP** - *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*; **IRE 1** - Inositol-requiring 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 inducible gene*), medeia a defosforilação de eIF2α, 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 homologous 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 pode-se 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 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 retículo apresenta uma rápida resposta a estímulos externos e tem papel importante na modulação direta da síntese proteica e sobre a apoptose, conseqüentemente, na manutenção do tecido muscular esquelético (MADARO, 2013) (Figura 3).

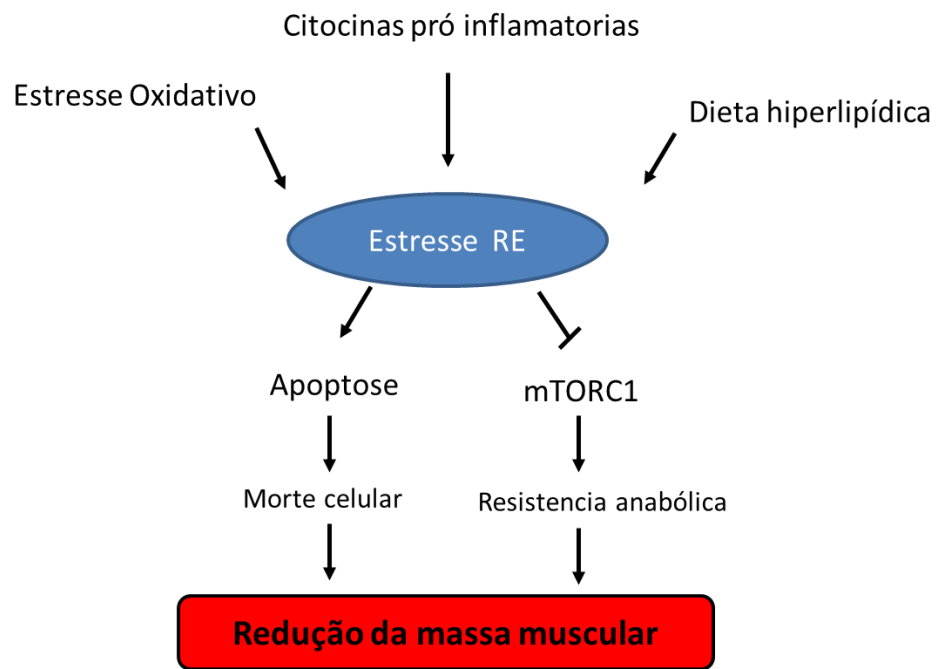


Figura 3 - Esquema representativo dos fatores indutores do estresse do retículo endoplasmático (ER) e as vias centrais ativadas a partir dessa resposta. **mTORC1**: complexo proteico 1 alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin complex 1*) (Adaptado Deldicque et al., 2013)

2 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 supra-fisiológica (100 mM).

O DHEA, em ambas as concentrações, reduz o estresse de RE induzido por ácido palmítico através de modulação da via PERK/eIF2 α /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.

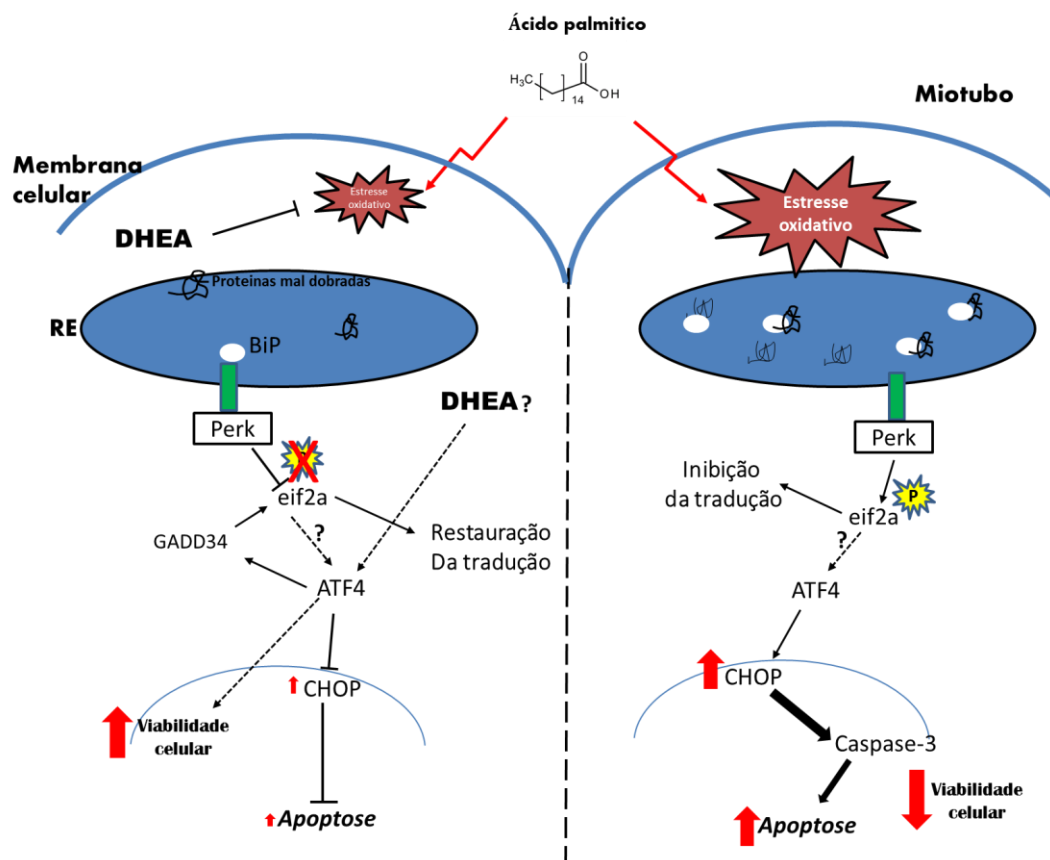


Figura 14 - Esquema proposto para a ação do DHEA sobre a citotoxicidade induzida por palmitato em miotubos L6

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 Differentiation: 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 stress-activated 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.

LIU D, SI H, REYNOLDS KA, ZHEN W, JIA Z, DILLON JS. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a Galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. **Endocrinology**, 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. Activation-dependent 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 alpha-estradiol 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 stearyl-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. Toll-like 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 factor-kappaB 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 ubiquitin-

proteasome 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, **Oncotarget**, 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.