JUAN PABLO ZÚÑIGA HERTZ

**INFLUÊNCIA DO COLESTEROL E DE
INTERMEDIÁRIOS DA SUA BIOSÍNTESE SOBRE A
MAQUINARIA DE SECREÇÃO DE INSULINA E A
ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DA MEMBRANA
PLASMÁTICA EM CÉLULAS SECRETORAS DE
INSULINA**

Tese 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 Ciências.

São Paulo
2014

JUAN PABLO ZÚÑIGA HERTZ

**INFLUÊNCIA DO COLESTEROL E DE INTERMEDIÁRIOS DA
SUA BIOSÍNTESE SOBRE A MAQUINARIA DE SECREÇÃO
DE INSULINA E A ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DA
MEMBRANA PLASMÁTICA EM CÉLULAS SECRETORAS
DE INSULINA**

Tese 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 Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rodrigues de
Moraes Abdulkader

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução parcial

Zúñiga-Hertz, Juan Pablo.

Influência do colesterol e de intermediários da sua biossíntese sobre a maquinaria de secreção de insulina e a organização funcional da membrana plasmática em células secretoras de insulina / Juan Pablo Zúñiga Hertz. – São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Colesterol e secreção de insulina.

Versão do título para o inglês: Influence of cholesterol and its biosynthesis intermediates on the insulin secretion machinery and the functional organization of the plasma membrane in insulin secreting cells.

1. Secreção 2. Insulina 3. Grupos Isoprenila 4. Colesterol 5. Membranas I. Abdulkader, Prof. Dr. Fernando Rodrigues de Moraes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB094/2014

Candidato(a): Juan Pablo Zúñiga Hertz.

Orientador(a): Prof. Dr. Fernando Rodrigues Moraes Abdulkader.

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **171** nas fls. **80** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito das estatinas sobre a secreção de insulina: estudos em células INS-1E e em modelo de obesidade em camundongos C57BL/6** do qual participou(aram) o(s) alunos **Juan Pablo Zuñiga Hertz**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **15.12.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2009.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **005** nas fls. **98** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Fernando R.M. Abdulkader**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Efeitos das estatinas sobre a secreção de insulina: efeitos pleiotrópicos em células INS-IE e em ilhotas pancreáticas de rato"* do qual participam o(s) alunos **Juan Pablo Zuñiga Hertz, Igor Qullis Martins**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.02.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

À minha mãe, que na sua luta diária e
ao meu pai, que na sua etérea
presença deram tudo na formação
não de um filho, mas de um cidadão
do bem.

AGRADECIMENTOS

Sem lugar a dúvidas, o grande dividendo obtido durante o doutorado, sem querer desmerecer a sua importância *per se*, não é a obtenção do título de PhD, mas sim a transformação vivenciada como cientista, cidadão e principalmente como ser humano. Luis Pasteur já falava que um pouco de ciência afasta de Deus, no entanto, muita ciência aproxima a Ele. A somatória de experiências acumuladas durante essa trilha não somente me conduziram a me aproximar, minimamente, à compreensão da perfeição da natureza, mas também me levaram a reconhecer o primado de Deus em cada aspecto da vida e caminhar sempre seguro e sem medo, nem do presente nem do porvir, sendo conduzido sempre pela fé. Portanto, a minha gratidão e agradecimento principal é e será sempre de Deus.

O reconhecimento do primado de Deus certamente leva a compreender que os caminhos da vida são impossíveis de serem trilhados em solidão. A ajuda material é sempre bem vinda, no entanto, a ajuda espiritual proporcionada, talvez inconscientemente por pessoas que me apoiaram, foi fundamental. No entanto, não poderia deixar de agradecer aqui à minha companheira Hadassa que não somente com o seu apoio e carinho incondicional me ajudou terminar esse processo, mas também, junto com a ajuda de Deus, impediu de ter desistido na hora da dificuldade. Ao Professor Fernando, meu orientador, que com a sua visão crítica permitiram a evolução desse trabalho e que, ao final das contas, ganhei nele mais que um colega, um amigo. Agradeço ao Eduardo pela ajuda, discussões e amizade. Ao Professor Rui que em 2009 literalmente me abriu as portas do ICB, ao laboratório da professora Nancy, do Professor Fábio, da Professora Carla e do Professor Britto, que graças ao apoio técnico viabilizaram esse processo. Agradeço ao Professor Hemal Patel e ao meu amigo Adam do *Cardiac/Neuroprotection Laboratories* da *University of California San Diego* onde desenvolvi meu doutorado sanduíche, abrindo novas fronteiras do meu conhecimento. Agradeço particularmente ao laboratório do Professor Angelo e às meninas. Agradeço a Ana e Anne que nesse ultimo ano não só tem sido as minhas amigas, mas junto com a Hadassa tem sido a minha família. Finalmente agradeço ao José Maria cuja ajuda foi fundamental, desde adaptar o edital de ingresso na pós-graduação para mim como estrangeiro, até a conclusão desse processo.

A todos os que de maneira direta ou indireta se viram envolvidos com a minha pessoa e com esse projeto, que mais que um projeto de pesquisa acabou sendo um projeto de vida, meu agradecimento profundo. Diz uma música da minha adolescência “*cuál es el precio que tenemos que pagar para que nuestros sueños se hagan realidad?*”. O preço que paguei foi alto, mas o pagamento divino e a satisfação da missão cumprida graças à ajuda de muitos, ultrapassa todas as expectativas.

“*Non Ducor Duco* - Não sou Conduzido, eu Conduzo.”

RESUMO

ZÚÑIGA-HERTZ, J. P. **Influência do colesterol e de intermediários da sua biossíntese sobre a maquinaria de secreção de insulina e a organização funcional da membrana plasmática em células secretoras de insulina.** 2014. 106 f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A rota de biossíntese de colesterol tem sido estudada pelo seu envolvimento em diversos processos celulares, entre eles a secreção de hormônios. Particularmente, a secreção de insulina estimulada pela glicose depende tanto do colesterol como de moléculas de natureza isoprenoide, que constituem intermediários da sua biossíntese. Com o intuito de entender a contribuição parcial dos grupos isoprenila e do colesterol para a secreção de insulina, foram utilizados inibidores de diferentes enzimas da rota de biossíntese de colesterol em linhagem de células secretoras de insulina INS-1E e em ilhotas pancreáticas isoladas de roedores. Foi analisada a contribuição tanto dos grupos isoprenila, particularmente o geranylgeranyl pirofosfato, quanto do próprio colesterol na secreção de insulina estimulada pela glicose, assim como o efeito do esterol em parâmetros físicos da membrana, estudados por EPR, e na estruturação da maquinaria de secreção em *lipid rafts*. A inibição aguda da HMG-CoA redutase com sinvastatina diminuiu a secreção de insulina sem afetar o conteúdo celular de colesterol; a suplementação com geranylgeranyl pirofosfato preveniu a inibição aguda da secreção induzida por sinvastatina. A inibição crônica da síntese de colesterol com sinvastatina inibiu a secreção de insulina com uma redução significativa no conteúdo de colesterol celular e da membrana, associado a um aumento da fluidez de membrana e desorganização dos *lipid rafts*. A administração de colesterol em células cuja biossíntese foi inibida com ácido zaragóxico a jusante da síntese de grupos isoprenila permitiu recuperar a função secretora. Esses resultados permitem estabelecer que a alteração da fluidez de membrana, responsável pela perda da organização estrutural e funcional da maquinaria de secreção em *lipid rafts*, é precedida pela redução da isoprenilação de proteínas na inibição da secreção de insulina estimulada pela glicose devida à inibição da biossíntese de colesterol, oferecendo assim um mecanismo pelo qual essa rota biossintética favorece a função de células beta pancreáticas.

Palavras-chave: Secreção. Insulina. Isoprenila. Colesterol. Membrana.

ABSTRACT

ZÚÑIGA-HERTZ, J. P. Influence of cholesterol and its biosynthesis intermediates on the insulin secretion machinery and the functional organization of the plasma membrane in insulin secreting cells. 2014. 106 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The cholesterol biosynthesis pathway has been proposed to be deeply involved in several cellular processes, particularly hormone secretion. The glucose-stimulated insulin secretion depends on cholesterol and isoprenoid molecules derived from its biosynthesis pathway. To understand the partial contribution of isoprenoid groups and of cholesterol on insulin secretion, inhibitors of different enzymes of the cholesterol biosynthesis pathway were used. The contribution of isoprenoid molecules, particularly geranylgeranyl pyrophosphate, and cholesterol to glucose-stimulated insulin secretion was analyzed. The involvement of cholesterol in the maintenance of membrane physical parameters, analyzed by EPR, and on the secretory machinery organization in lipid rafts was studied. The acute inhibition of HMG-CoA reductase with simvastatin reduced insulin secretion without affecting the total cellular cholesterol content. The loading of INS-1E cells with geranylgeranyl pyrophosphate prevented the acute simvastatin effect. The chronic inhibition of cholesterol biosynthesis with simvastatin reduced glucose-stimulated insulin secretion with a significant reduction in the cellular and membrane cholesterol contents, since an increase in the plasma membrane fluidity was observed as well as the loss of the localization of secretory machinery proteins in lipid raft. The cholesterol refilling of INS-1E cells after 24h inhibition of cholesterol biosynthesis with zaragozic acid led to a recovery of the secretory function, since this molecule inhibits cholesterol biosynthesis downstream of the isoprenoid groups formation. These results indicate that the membrane fluidity impairment, responsible for the loss of the structural and functional organization of the secretory machinery in lipid rafts, is preceded by reduction in protein isoprenylation in the glucose-stimulated insulin secretion inhibition due to cholesterol biosynthesis pathway inhibition.

Keywords: Secretion. Insulin. Isoprenyl. Cholesterol. Membrane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rota de biossíntese do colesterol e moléculas isoprenoides.....	29
Figura 2 – Princípio por trás do EPR como estratégia de medida de parâmetros físicos de membrana.....	39
Figura 3 – O tratamento agudo (2h) com SIM inibe a GSIS sem afetar o conteúdo celular de colesterol e a síntese de insulina.....	51
Figura 4 – O tratamento agudo (2h) com SIM inibe a GSIS em ilhotas pancreáticas de rato.....	52
Figura 5 – O tratamento agudo (2h) com ZGA não afeta a GSIS. O conteúdo total de insulina permanece sem alterações.....	53
Figura 6 – O tratamento agudo com SIM inibe a GSIS através da inibição da geranilgeranilação de proteínas.....	55
Figura 7 – O tratamento crônico (24h) com SIM inibe a GSIS e reduz significativamente o conteúdo celular de colesterol.....	58
Figura 8 – O tratamento crônico (24h) com ZGA reduz significativamente o colesterol celular, inibindo a GSIS.....	59
Figura 9 – A marcação de <i>clusters</i> de <i>lipid rafts</i> de membrana é afetada após tratamentos que reduzem significativamente o conteúdo celular de colesterol.....	60
Figura 10 – O tratamento crônico com SIM modifica características físicas de membrana, aumentando a sua fluidez.....	62
Figura 11 – O tratamento crônico com SIM leva a uma redistribuição na membrana de proteínas como Ca _v 1.2 e Syn1A junto com uma diminuição do conteúdo de colesterol de microdomínios de membrana.....	64
Figura 12 – A restituição do colesterol após o tratamento crônico (24h) com ZGA restabelece o colesterol celular e, parcialmente, a GSIS em células INS-1E.....	66
Figura 13 – O tratamento crônico de ilhotas pancreáticas de camundongo com ZGA diminui a GSIS.....	68

Figura 14 – O tratamento crônico de ilhotas de rato com SIM diminui as correntes de entrada de Ca^{2+} ; tanto o tratamento agudo como o crônico diminuem os eventos de fusão à membrana.....	70
Figura 15 – O tratamento de ratos com SIM durante 7 dias aumenta a GSIS, que desaparece com o tratamento durante 15 dias.....	72
Figura 16 – Participação do colesterol e de intermediários de sua biossíntese na secreção de insulina.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GSIS- Secreção de insulina estimulada pela glicose (do inglês *glucose-stimulated insulin secretion*)

SIM- Sinvastatina

ZGA- Ácido zaragózico

M β CD- Metil- β -ciclodextrina

GGPP- Geranilgeranil pirofosfato

GGTi- Inibidor da geranilgeranil transferase do tipo I

CHOL- Colesterol

PRAV- Pravastastina

HMG-CoA redutase- Hidroximetilglutaril-CoA-redutase

EPR- Espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons

5-DSA- Ácido-5-doxilesteárico

(τ_{corr})- Tempo de correlação rotacional

SNARE- Do inglês *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein (SNAP) receptor*

Syn1A- Sintaxina 1A

Ca_v1.2- Canal para cálcio do tipo L

VAMP- Do inglês *vesicle associated membrane protein*

SNAP25- Do inglês *soluble NSF attachment protein-25*

Cav1- Caveolina 1

DRMs- Membranas resistentes a detergentes (do inglês *detergent resistant membranes*)

CPE- Carboxipeptidase E

PC1/3- Pro-hormônio convertase 1/3

PC2- Pro-hormônio convertase 2

SNARE- *soluble NSF attachment protein receptor*

CGA- Cromogranina A

Sgl- Secretogranina I

SgII- Secretogranina II

SgIII- Secretogranina III

SgV- Secretogranina V

SgVII- Secretogranina VII

ROI- Do inglês *regions of interest*

RIE- Radioimunoensaio

HRP- Do inglês *horseradish peroxidase*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Aspectos Gerais.....	20
1.2 A célula beta pancreática como modelo de estudo de secreção.....	21
1.2.1 Biogênese e amadurecimento do grânulo de insulina.....	21
1.2.2 Características dinâmicas da secreção de insulina.....	23
1.2.2.1 Tráfego do grânulo de insulina.....	23
1.2.2.2 Dinâmica da secreção de insulina.....	24
1.2.3 Mecanismos de fusão de grânulo de secreção: complexo SNARE.....	25
1.3 Intermediários da biossíntese de colesterol: isoprenilação de proteínas e participação na função da célula beta.....	27
1.3.1 Biossíntese de colesterol.....	27
1.3.2 Isoprenilação de proteínas: GTPases pequenas e sua função na célula beta.....	30
1.4 Colesterol como organizador estrutural e funcional da membrana plasmática.....	31
1.4.1 Colesterol e propriedades físicas de membrana. Lipid rafts.....	31
1.4.2 Colesterol como modulador da secreção de insulina.....	34
1.5 EPR e isolamento de lipid rafts como estratégias para a análise estrutural da membrana plasmática de células secretoras.....	35
1.5.1 Aspectos teóricos da espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons.....	37
1.6 Secreção de insulina e rota de biossíntese de colesterol: dependência bivalente ou multifatorial? Por que utilizar a célula beta como modelo de estudo de secreção e sua relação com a biossíntese de colesterol.....	40
2 OBJETIVOS.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4 RESULTADOS.....	50
4.1 O tratamento agudo (2h) com sinvastatina, mas não com ácido zaragózico, diminui a secreção de insulina estimulada pela glicose sem afetar o conteúdo celular de colesterol nem o conteúdo total de insulina.....	50

4.2 O tratamento agudo com sinvastatina inibe a secreção de insulina através de um mecanismo dependente de geranilgeranilação de proteínas.....	54
4.3 Os tratamentos crônicos (24h) com sinvastatina e ácido zaragózico diminuem a secreção de insulina estimulada pela glicose, reduzindo o conteúdo celular de colesterol.....	56
4.4 O tratamento crônico com SIM aumenta a fluidez da membrana plasmática das células INS-1E.....	61
4.5 O tratamento crônico com SIM desorganiza a membrana plasmática, alterando a distribuição de proteínas como o canal para cálcio do tipo L (Ca _v 1.2) e syntaxina 1A (Syn1a) , entre outras, em frações de membrana de células INS-1E.....	63
4.6 O suplemento com colesterol em células previamente tratadas com ZGA durante 24h restitui parcialmente a GSIS com um aumento do conteúdo celular de colesterol.....	65
4.7 O tratamento crônico de ilhotas pancreáticas de camundongo com ZGA diminui a secreção de insulina estimulada pela glicose.....	67
4.8 O tratamento crônico de ilhotas de rato com SIM diminui a corrente de Ca ²⁺ . O tratamento agudo e crônico com SIM diminui os eventos de fusão de grânulo à membrana, medidos por análise de capacitância.....	69
4.9 O tratamento de ratos com sinvastatina por via oral em tempos diferentes gera efeitos distintos na secreção de insulina estimulada pela glicose de ilhotas pancreáticas isoladas.....	71
5 DISCUSSÃO.....	73
5.1 A inibição aguda da biossíntese de colesterol diminui a secreção de insulina como consequência da redução dos grupos isoprenila em células INS-1E.....	73
5.1.1 <i>A secreção de insulina estimulada pela glicose depende da síntese de intermediários isoprenoides.....</i>	73
5.1.2 <i>O tratamento agudo com SIM inibe a GSIS sem alterar o conteúdo total de insulina.....</i>	76
5.1.3 <i>Os intermediários de biossíntese de colesterol são críticos para a GSIS.....</i>	77
5.1.4 <i>O geranilgeranil pirofosfato contribui para a GSIS em células INS-1E.....</i>	78
5.2 A inibição crônica da rota de biossíntese de colesterol diminui a secreção de insulina estimulada pela glicose como consequência da alteração estrutural e funcional da membrana de células INS-1E.....	80
5.2.1 <i>O conteúdo de colesterol celular é determinante para o processo de secreção de insulina acontecer apropriadamente.....</i>	81

5.2.1.1 Efeitos da perda de colesterol em outras estruturas celulares.....	83
5.2.1.2 Efeito paradoxal do conteúdo de colesterol de membrana.....	85
5.2.1.3 Efeito das estatinas nas membranas biológicas: efeito diferencial segundo a natureza química da estatina.....	87
5.2.2 As propriedades físicas de membrana determinam sua organização funcional.....	88
5.2.2.1 A redução do colesterol de membrana conduz à alteração de propriedades físicas da membrana, levando-a à “randomização” estrutural: alteração da organização do complexo SNARE.....	88
5.2.2.1.1 DRMs: lipid rafts ou artefato experimental?.....	91
5.2.2.2 A randomização de membrana leva à alteração funcional de elementos chaves do processo de secreção: função do canal para cálcio.....	94
5.2.3 A recuperação do colesterol celular restabelece a capacidade de secreção de insulina.....	94
5.3 O tratamento crônico com sinvastatina em modelo <i>in vivo</i> gera efeitos diversos.....	96
6 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A insulina é o principal hormônio que controla o metabolismo energético. Após a sua síntese, é armazenada em grânulos de núcleo denso cujo conteúdo é secretado através da via de secreção regulada¹. O processo de secreção da insulina frente a um incremento mantido da concentração extracelular de glicose tem a particularidade de ser bifásico, com uma primeira fase de secreção rápida, e uma segunda, sustentada no tempo². Essa característica baseia-se na existência de duas populações de grânulo de secreção presentes no citoplasma da célula beta. Uma primeira população corresponde aos grânulos já capacitados para secreção, possivelmente aqueles previamente ancorados à membrana plasmática, enquanto que os segundos constituem os grânulos que se encontram no citosol que migrarão até locais específicos da membrana, durante a segunda fase. A fusão do grânulo à membrana tem sido amplamente estudada. Durante o processo, os grânulos de insulina se fundem à membrana plasmática assistidos por proteínas conhecidas como SNAREs (*soluble NSF attachment protein receptor*), as quais, junto com o canal para cálcio do tipo L, responsável pelo influxo local de cálcio que induz a fusão do grânulo, constituem a maquinaria de secreção. As SNAREs dividem-se em vSNAREs (localizadas no grânulo) como VAMP, e em tSNAREs (localizadas na membrana plasmática) como Sintaxina 1 e SNAP 25^{3, 4}.

A maquinaria de secreção encontra-se organizada em microdomínios de membrana também chamados de *lipid rafts*. Essas estruturas, cuja organização decorre da alta concentração de colesterol e do tipo de fosfolipídios que apresentam, têm sido amplamente estudadas por auxiliarem diversos processos biológicos⁵. Considerando o papel do colesterol como elemento organizador da estrutura da membrana plasmática, o que traz como consequência uma complexa organização funcional, processos biológicos como o fenômeno da secreção têm se demonstrado serem altamente dependentes da rota de biossíntese de colesterol. Dita dependência deve-se tanto à modulação que intermediários de reação, os grupos isoprenila, exercem sobre a função da célula beta, quanto à presença do colesterol *per se* na funcionalidade da membrana.

1.2 A célula beta pancreática como modelo de estudo de secreção

1.2.1 Biogênese e amadurecimento do grânulo de insulina

O processo de secreção de moléculas, sejam hormônios⁶ ou neuropeptídeos⁷, requer três eventos fundamentais: destinação ou *sorting* na rede *trans*-Golgi da molécula para grânulos de secreção regulada, tráfego dos grânulos de secreção até a membrana plasmática e fusão do grânulo com a membrana para a liberação do seu conteúdo ou *cargo*. A célula beta pancreática é a responsável pela secreção de insulina, principal hormônio controlador do metabolismo energético. Apesar de não se ter muito conhecimento sobre o mecanismo de destinação ou *sorting* da pró-insulina em grânulos de secreção regulada, é possível que existam um ou mais domínios de destinação presentes na estrutura da proteína, garantido sua interação com receptores de destinação na rede *trans*-Golgi. Tal processo de *sorting* ou destinação acontece com alta eficiência na destinação de pró-insulina para grânulos de secreção regulada; mais de 99% da pro-insulina é destinada para esta via e uma baixa porcentagem segue o caminho da via de secreção constitutiva¹. Os mecanismos de *sorting* na rede *trans*-Golgi incluem a participação de receptores, localizados em *lipid rafts*, que facilitam a apropriada destinação dos pró-hormônios aos grânulos de secreção. Um destes receptores é a carboxipeptidase E (CPE), que não somente assiste o *sorting* da pró-insulina, mas também é destinada ao próprio grânulo de secreção, onde participa do processamento da pró-insulina em insulina.

Posteriormente à destinação da pró-insulina aos grânulos de secreção, o grânulo passa por um processo de amadurecimento, período em que não somente acontecerá o processamento do pró-hormônio, mas também a preparação do próprio grânulo para o seu tráfego e secreção. O preparo do conteúdo de insulina a ser secretado é feito através da acidificação do interior do grânulo. Dito evento acontece graças à expressão de bombas de H⁺; experimentos farmacológicos de inibição dessas bombas, que resultam na inibição da conversão de pró-insulina para insulina, demonstraram o papel da acidificação do grânulo para o processamento do pró-hormônio⁸. Após a acidificação do lúmen do grânulo, a pró-insulina é processada pelas pró-hormônios convertases PC1/3, PC2 e CPE. Com isso se obtêm um grânulo cujo conteúdo é fundamentalmente insulina e só uma baixa quantidade de peptídeo C. Finalmente, a remoção de clatrina, localizada na membrana do grânulo, é parte do processo de amadurecimento.

Um dos aspectos característicos dos grânulos de secreção é a sua estrutura elétron-densa observável através de microscopia eletrônica. No caso do grânulo de insulina, essa característica surge como parte do amadurecimento-processamento da pró-insulina e formação de hexâmeros de insulina complexada com zinco, formando dessa maneira cristais que conferem ao grânulo um núcleo denso. Todavia, o grânulo de insulina representa uma complexa entidade que não se resume simplesmente a uma estrutura de armazenagem de insulina, a qual constitui aproximadamente 60% do conteúdo proteico do grânulo. O restante é formado por mais de 50 proteínas. Dessas, é interessante destacar 3 subgrupos de proteínas, divididos aqui, arbitrariamente, segundo as funções que desempenham. O primeiro deles corresponde às pró-hormônio convertases. Tal como foram citadas acima, essas enzimas começam sua função biológica na rede *trans*-Golgi agindo como receptores de destinação de pró-insulina para logo, como parte do grânulo, agirem no processamento do pró-hormônio, gerando o peptídio C e insulina⁹. De maneira interessante, particularmente PC1 e PC2 participam no processamento pós-traducional de outra família de proteínas que compõem o segundo subgrupo: as graninas. O grânulo de insulina possui cromogranina A (CGA) e secretogranina I (SgI), II (SgII), III (SgIII), V (SgV) e VII (SgVII). Essa família de proteínas tem sido relacionada com o processo de destinação ou *sorting* de peptídios aos grânulos de secreção regulada, bem como com o processo de tráfego de grânulos. Particularmente a CGA tem sido relacionada com o processo de biogênese do grânulo de insulina¹⁰; tem se mostrado que o processamento de CGA por PC1 e 2 gera peptídios biologicamente ativos como a betagranina e pancreastatina, as quais inibem a secreção de insulina¹¹. O terceiro grupo é composto pelas vSNAREs (do inglês *soluble NSF attachment protein receptor*; o prefixo “v” faz referência à localização na vesícula de secreção). Esse grupo de proteínas, que compõem a maquinaria de secreção, será analisado na seção **1.2.3**.

1.2.2 Características dinâmicas da secreção de insulina

1.2.2.1 Tráfego do grânulo de insulina

A secreção de insulina começa com um evento anterior à própria fusão do grânulo à membrana plasmática: o seu tráfego. O processo inicia-se com a formação do grânulo de insulina na rede *trans* Golgi assistido por proteínas específicas de *sorting* como SgIII, CPE e PC1/3 e 2. O processo de migração requer a interação do grânulo com citoesqueleto. Para tal efeito, o grânulo associa-se à quinesina, particularmente a cadeias pesadas de quinesina convencional (KHC, do inglês *conventional kinesin heavy chains*). De maneira interessante, tem se mostrado que a superexpressão de um dominante negativo de quinesina em células INS-1 e MIN6 que são linhagens de células beta pancreáticas inibe a secreção de hormônio do crescimento superexpresso, só após 90min do estímulo de secreção. Todavia, durante os primeiros 20min de secreção, não se observou nenhum efeito inibitório. Por outra parte, a superexpressão de quinesina não incrementa significativamente a secreção do hormônio¹², o que permite estabelecer que o processo de tráfego do grânulo deve envolver outros mecanismos que garantam a migração do grânulo até locais específicos de membrana, e não somente a interação com citoesqueleto através de motores proteicos. Entre esses fatores se encontram proteínas pertencentes à família das proteínas G pequenas, que se encontram altamente envolvidas com a secreção de insulina. Trataremos delas particularmente no item 1.3. Brevemente, no caso particular de Cdc42 e Rac1, estas permitem o remodelamento do citoesqueleto e ancoragem do grânulo à membrana plasmática.

Na célula beta existem pelo menos duas grandes populações de grânulos de secreção: os grânulos de insulina e as microvesículas do tipo sinápticas (SLMVs, do inglês *synaptic-like microvesicles*). No caso dos grânulos de insulina, se distinguem duas populações: o *pool* de grânulos permanentemente ancorados à membrana plasmática e um *pool* de reserva localizado no citosol chamado de *newcomer*. Essas duas populações seriam as responsáveis pela primeira e segunda fase de secreção, respectivamente. Para a manutenção da secreção de insulina em resposta ao estímulo de alta glicose, a população de grânulos localizados no citoplasma, os *newcomers*, são recrutados até os locais de secreção na membrana plasmática. Dessa maneira, cabe pensar que, para permitir uma alta eficiência no tráfego de

grânulos até locais específicos de membrana, é necessária uma movimentação organizada das entidades de secreção. A simples movimentação aleatória dos grânulos de secreção até as imediações da membrana plasmática, junto com a ancoragem em locais aleatórios da membrana teria um elevado custo, desde o ponto de vista da eficiência com que o hormônio seria secretado, assim como a quantidade de insulina a ser liberada. Tem se mostrado através da utilização de insulina marcada com proteína fluorescente verde que existem diversas populações de grânulos que se mobilizam após estímulo metabólico¹³. Todavia, apesar da existência de novas técnicas que permitem a visualização e seguimento de grânulos de secreção, o que é claro é que a movimentação de grânulos é coordenada por diversos mediadores celulares, como as proteínas G pequenas (que serão abordadas mais a frente), associação com microtúbulos e filamentos de actina, entre outros, os quais são ativados por estímulos metabólicos. De maneira interessante, esse tipo de estímulos exerce um controle também sobre o evento seguinte à migração do grânulo: a sua fusão com a membrana plasmática. A dinâmica da secreção e a fusão do grânulo já se encontram amplamente documentados, todavia permanecem ainda por ser elucidados numerosos eventos reguladores por trás destes eventos.

1.2.2.2 Dinâmica da secreção de insulina

A característica distintiva do fenômeno da secreção é o acoplamento metabólico e elétrico que acontece na célula beta. Sendo a insulina o principal hormônio responsável pelo controle da glicemia no indivíduo, a célula beta é em si mesma um complexo sistema de integração de sinais metabólicos frente aos quais responde secretando o hormônio. Dentre esses sinais se encontram a própria glicose, ácidos graxos e aminoácidos que, em alta concentração, estimulam a secreção de insulina. Uma vez no citosol, a glicose é rapidamente metabolizada pela glicoquinase, que gera glicose-6-fosfato, passo limitante da glicólise e definido também como sensor de glicose. Posteriormente, através da própria glicólise e ciclo de Krebs, é gerado um incremento na razão ATP/ADP. Esse evento representa ser um fato fundamental que levará aos eventos subsequentes que concluem com a fusão da membrana do grânulo de insulina com a membrana plasmática, liberando o hormônio.

O aumento da razão ATP/ADP no citosol da célula beta, como consequência da aceleração do metabolismo, produz o fechamento de canais para potássio sensíveis a ATP. Consequentemente, uma diminuição na condutância da membrana plasmática ao potássio é observada. O fechamento destes canais, tetrâmeros compostos pelo receptor de sulfonilureia (SUR) e o canal para potássio retificador de influxo, Kir 6.2, permite uma despolarização transitória da membrana plasmática. Esse evento conduz, por sua vez, à abertura de canais para cálcio sensíveis a voltagem, permitindo um influxo de Ca^{2+} . De maneira interessante, o influxo de cálcio segue um padrão oscilatório que se reflete em uma secreção de insulina também oscilatória. Portanto, ao observar essa sequência de eventos, foi descrito por Henquin¹⁴ que o canal para potássio sensível ao ATP age como um transdutor de sinais, desde o aumento da atividade metabólica até mudanças elétricas que trarão consigo, finalmente, a secreção. O sinal que o cálcio representa é de grande importância para a maquinaria de exocitose. O complexo de proteínas que compõe a maquinaria de secreção, complexo SNARE, possui a sinaptotagmina, que, com sua atividade de sensor para cálcio, permite o fechamento do complexo SNARE, facilitando a fusão do grânulo à membrana. Isto será abordado com detalhe na seção 1.2.3.

1.2.3 Mecanismos de fusão de grânulo de secreção: complexo SNARE

O processo de secreção, de insulina no caso do presente trabalho, tem como evento final a fusão da membrana do grânulo com a membrana plasmática em locais específicos desta. De um ponto de vista termodinâmico, a formação do chamado poro de fusão, que se estabelece pela fusão das membranas do grânulo à membrana plasmática, não é um evento espontâneo. A energia de ativação para a fusão de bicamadas lipídicas é de 50 a $100k_B T$ ³. Em modelos de bicamadas lipídicas, se propõe que a formação do poro de fusão é precedida por outros estados intermediários chamados de hemifusão¹⁵. Como consequência, é necessário que exista um mecanismo que facilite a fusão do grânulo com alta eficiência (menor custo energético e maior velocidade) para assim o *cargo* ser liberado de acordo com os requerimentos fisiológicos.

A maquinaria de secreção que provê a força que permite a fusão de membranas corresponde ao chamado complexo SNARE. Esse complexo se compõe

de 3 proteínas fundamentais que farão uma ponte entre a membrana do grânulo e a membrana plasmática: SNAP-25 (do inglês *soluble NSF attachment protein-25*) e syntaxina-1 (Syn1) que se localizam na membrana plasmática, razão pela qual são denominadas de tSNAREs (*t* do inglês *target* ou alvo), e VAMP (do inglês *vesicle-associated membrane protein*), que se localiza na membrana do grânulo de secreção, motivo pelo qual se diz que VAMP é uma vSNARE (*v* do inglês *vesicle* ou vesícula). As SNAREs da membrana plasmática e do grânulo interagem se entrelaçando, formando um complexo proteico chamado de complexo *trans*-SNARE ou SNARE-pin. De acordo com o modelo proposto³, esse complexo, após estímulo, fecha-se da mesma maneira que um zíper, gerando uma força de torção de $35 k_B T$ por cada complexo *trans*-SNARE, propiciando desta maneira a fusão das membranas do grânulo e plasmática após a formação de três complexos *trans*-SNARE, provendo da força equivalente para a fusão das membranas ($100 k_B T$).

Considerando que os hormônios e neuropeptídeos fazem parte de grânulos de secreção regulada, estes são secretados após estímulo, de maneira que o complexo SNARE se encontra sob o controle de outras proteínas e sinais, particularmente o cálcio. Esses determinarão o momento em que o fechamento do complexo *trans*-SNARE acontece, garantindo que não aconteçam eventos de fusão inespecíficos. Para tanto, existem proteínas da família das SNARE que exercem um controle local no arranjo do complexo; de um ponto de vista funcional, os mecanismos de controle agem como um “freio molecular” que responderá a um estímulo para liberar o complexo SNARE previamente arranjado. Tal é o caso da complexina e sinaptotagmina. Complexina estabiliza o complexo *trans*-SNARE em grânulos previamente ancorados à membrana, garantindo que o fechamento espontâneo da conformação zíper do complexo SNARE não aconteça. Sinaptotagmina corresponde ao sensor para Ca^{2+} . A formação do complexo Ca^{2+} -sinaptotagmina permite mudanças de conformação da proteína, liberando a complexina, o que por sua vez permite a formação do complexo *cis*-SNARE e a consequente fusão das membranas do grânulo e celular.

De maneira interessante, tem sido proposto que existam outros mecanismos de controle da fusão de grânulos mediados por proteínas que não fazem parte da família das SNARE. Dentre essas se encontra a GTPase pequena Cdc42 que, na sua forma associada a GTP como consequência do estímulo metabólico, no caso da

célula beta, liberaria a proteína Caveolina 1 (Cav1) e esta, por sua vez, o complexo *trans*-SNARE, permitindo a fusão do grânulo de insulina e a secreção do hormônio¹⁶.

Ademais, a maquinaria de secreção se encontraria organizada em regiões específicas da membrana, e não em uma distribuição aleatória¹⁶, que corresponderiam a domínios funcionais da membrana plasmática. Essas regiões específicas se formariam graças a uma composição bioquímica diferenciada que inclui tipos específicos de fosfolípidios e particularmente um alto conteúdo de colesterol, criando uma balsa lipídica que flutua na membrana plasmática, razão pela qual estes domínios foram denominados de *lipid rafts*. Essas entidades estruturais e funcionais organizam eventos celulares no nível da membrana, entre os quais se encontraria a secreção. Estudar o papel do colesterol na organização desses domínios funcionais ricos em colesterol fundamentais para a secreção foi um dos objetivos propostos durante o projeto relatado na presente tese. Para isso, foi escolhida a linhagem celular de células beta, INS-1E, como modelo de secreção. Todavia, e de maneira interessante, no processo de secreção de insulina, que inclui o tráfego e ancoragem de grânulo proposto com anterioridade, contribuem moléculas que são derivadas da via de biossíntese de colesterol. Consequentemente, o envolvimento do processo secretório da célula beta com o colesterol e seus intermediários de biossíntese é relevante.

1.3 Intermediários da biossíntese de colesterol: isoprenilação de proteínas e participação na função da célula beta

1.3.1 Biossíntese de colesterol

Os esteróis participam de diversas funções celulares. Todavia, o tipo de esterol requerido é diferente em cada reino. No caso de células de mamíferos, não é possível o crescimento e desenvolvimento celular na ausência de colesterol. Por sua vez, leveduras requerem ergosterol e plantas, sitosterol e estigmasterol¹⁷. As funções celulares que os diferentes esteróis têm parecem ser altamente específicas, já que, mesmo possuindo estruturas químicas semelhantes, os esteróis não são substituíveis, isto é, células de mamíferos não são competentes se o colesterol for substituído por ergosterol. Isso faz pensar que devem existir mecanismos celulares de reconhecimento do tipo de esterol presente, assim como uma alta especialização de funções dependentes, no caso de células de mamífero, do colesterol. Esta alta

dependência do colesterol para numerosos eventos celulares permite, ao mesmo tempo, justificar por que as células de mamífero assumem o alto custo energético que significa sintetizar o colesterol. A síntese de colesterol a partir de acetil-CoA requer 30 reações químicas catalisadas por enzimas, uma alta quantidade de equivalentes de redução (NADH e NADPH), cofatores enzimáticos e oxigênio molecular¹⁷.

O colesterol é conhecido pelo seu envolvimento na estrutura da membrana plasmática, do qual decorre o controle de eventos celulares que nela acontecem, mas também é importante para a síntese de mediadores esteroides. Todavia, moléculas que constituem intermediários da sua síntese possuem diversas funções celulares (**Figura 1**). A formação de moléculas de natureza isoprenoide corresponde a um passo crítico da rota de biossíntese do ponto de vista funcional, pois estes são requeridos como mediadores de diversos processos biológicos. Particularmente o farnesil pirofosfato, requerido para a farnesilação de proteínas (incorporação pós-traducional do grupo FPP na estrutura de proteínas), é necessário também para a síntese do grupo heme; o geranylgeranyl pirofosfato, por sua vez, é requerido para a geranylgeranilação de proteínas e síntese de dolicol e ubiquitina^{18, 19}. Consequentemente, a inibição da rota de biossíntese do colesterol na sua reação limitante, a síntese de mevalonato, catalisada pela hidroximetilglutaril-CoA redutase que é o alvo farmacológico das estatinas, fármacos que diminuem o colesterol plasmático em pacientes com dislipidemia, poderia trazer consigo diversas consequências funcionais ao nível celular.

As estatinas são fármacos amplamente utilizados como estratégia clínica para a redução de altos níveis de colesterol plasmático, quadro frequentemente encontrado em pacientes com diabetes melito do tipo II e síndrome metabólica. Todavia, as estatinas são conhecidas também pela geração de diversos efeitos secundários à redução de colesterol, os chamados efeitos pleiotrópicos. Desses efeitos, os decorrentes da diminuição do farnesil pirofosfato, FPP, e do geranylgeranyl pirofosfato, GGPP, também chamados de grupos isoprenila (**Figura 1**), têm sido estudados pelo seu envolvimento com o processo de secreção de insulina^{20, 21}. Pesquisas desenvolvidas no começo dos anos 1990 demonstraram que a inibição da HMG-CoA redutase com lovastatina em ilhotas de rato gerava um aumento na localização citosólica de proteínas que se ligam a GTP após 18h de tratamento, juntamente com a diminuição destas na membrana plasmática²⁰.

Dentre as estatinas, a sinvastatina é a mais utilizada na clínica, sendo incluída em 2009 pela Organização Mundial da Saúde na Lista de Medicamentos Essenciais^{22, 23}. As estatinas são inibidores da enzima limitante da biossíntese de colesterol, hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase). A reação catalisada por essa enzima gera como produto o mevalonato, que é substrato para a formação de FPP (composto de 15C). Esse último leva tanto à síntese de colesterol, com esqualeno como intermediário de reação, como à síntese de GGPP (composto de 20C) (**Figura 1**). A inibição da síntese de esqualeno com moléculas como o ácido zaragósico (ZGA) leva à inibição da síntese de colesterol sem afetar a formação de FPP e GGPP^{24, 25}. Dessa maneira, a utilização de inibidores específicos de pontos particulares da rota de biossíntese de colesterol permite estudar a participação diferenciada de cada intermediário da via metabólica. Essa estratégia foi utilizada durante o presente trabalho para avaliar, de maneira diferenciada, a contribuição que os intermediários isoprenoides e o colesterol têm para a secreção de insulina estimulada pela glicose em células beta.

Figura 1 - Rota de biossíntese do colesterol e moléculas isoprenoides.

1.3.2 Isoprenilação de proteínas: GTPases pequenas e sua função na célula beta

Através de estudos desenvolvidos nos anos 1990 com inibidores da síntese de GTP, determinou-se que a família de proteínas conhecidas como proteínas G de união do GTP ou GTPases, deviam possuir um papel na secreção de insulina²⁶. Dos três tipos de proteínas G que executam funções nas células beta, às denominadas proteínas G pequenas, proteínas monoméricas de 17-30 kDa, têm se mostrado que executam funções nos processos de destinação de proteínas, tráfego e ancoragem de grânulos²⁷. De maneira interessante, esse tipo de proteínas requer a incorporação de grupos de natureza hidrofóbica na sua estrutura, particularmente de grupos isoprenila (FPP e GGPP), para desenvolverem a sua função biológica.

Esse tipo de proteínas G incorpora os grupos isoprenila em uma sequência consenso localizada no extremo carboxi-terminal composta por uma cisteína, dois aminoácidos alifáticos e um aminoácido terminal, sequência comumente denominada de CAAX. Em uma sequência de reações, o grupo isoprenila, geranylgeranyl, por exemplo, se liga à cisteína através de uma ligação tioéter, reação catalisada pela enzima geranylgeranyl transferase, para então os três aminoácidos terminais (AAX), serem removidos pela enzima conversora de Ras para finalmente, através da enzima isoprenillocisteína-O-carboxil metiltransferase, ser metilado o ânion carboxil da cisteína isoprenilada. Ademais, a geranylgeranyl transferase é uma enzima ativa em alta concentração de glicose, condição que relaciona ainda mais a isoprenilação de proteínas com a secreção de insulina estimulada pela glicose. Aparentemente a incorporação de moléculas de natureza isoprenila nessas proteínas constitui um requisito funcional.

A incorporação de moléculas hidrofóbicas na estrutura de proteínas tem, entre outras funções, a de agir como domínios de ancoragem à membrana. Tem se mostrado que, das modificações pós-traducionais que incorporam moléculas hidrofóbicas (metilação, palmitoilação, farnesilação e geranylgeranilação), pela sua hidrofobicidade, o grupo geranylgeranilo é aquele que confere uma maior capacidade para a proteína interagir com a membrana plasmática^{28, 29}. Particularmente, Rac1 é uma proteína solúvel envolvida com o processo de tráfego de grânulo que, todavia, não possui domínios trans-membrana, de maneira que é necessária a incorporação de um grupo isoprenila para esta interagir com membrana. Tem se mostrado que a inibição da rota de biossíntese de colesterol com atorvastatina em células endoteliais

diminui a translocação de Rac1 à membrana³⁰; em células INS-1 a translocação de Rac1 à membrana é um processo estimulado pela glicose³¹, o que por sua vez aumenta a sua atividade GTPase. Por sua vez, Cdc42, que se associa à ancoragem do grânulo de insulina à membrana, apresenta um domínio de geranilgeranilação que permitiria a interação com proteínas como caveolina 1 e proteínas do complexo SNARE. Após estímulo metabólico (*i. e*, aumento da concentração de glicose) Cdc42-GTP liberaria caveolina 1, permitindo o complexo SNARE favorecer a fusão das membranas³².

Nesse sentido, apesar de que a atividade biológica das GTPases pequenas como Rac1 e Cdc42 é dependente da transição entre as formas associadas a GDP e GTP, existe controvérsia se a isoprenilação terá um efeito ativador ou inibidor da proteína, tal como é o caso de outros tipos de modificações pós-traducionais como fosforilações. Dessa maneira, a incorporação de grupos isoprenila na estrutura de proteínas aparece então como uma modificação estrutural que determinará a localização subcelular, neste caso de Rac1 e Cdc42, o que seria crítico para o processo por elas modulado (tráfego e ancoragem do grânulo para Rac1 e Cdc42, respectivamente).

1.4 Colesterol como organizador estrutural e funcional da membrana plasmática

1.4.1 Colesterol e propriedades físicas de membrana. Lipid rafts

A característica mais distintiva das membranas biológicas é a sua natureza lipídica. O colesterol é o segundo maior constituinte lipídico das membranas, podendo variar a sua proporção segundo o tipo celular, mas, em geral, a proporção fosfolipídios:colesterol é de aproximadamente 1:1^{33, 34}. O conteúdo proteico das membranas biológicas, por sua vez, contribui de forma importante para a especialização de função dos diferentes tipos celulares³⁵. Em termos moleculares, a característica física mais notável do colesterol são os anéis esteroides planares, os quais são relativamente inflexíveis de um ponto de vista conformacional. Esse fato é de importância fundamental para a organização estrutural da membrana plasmática. Apesar da alta hidrofobicidade da molécula de colesterol, esta não se localiza na região mais profunda da porção hidrofóbica da bicamada lipídica, isto como

consequência da presença de um grupo hidroxila com o qual interage com os grupos polares dos fosfolipídios de membrana. Esse aspecto tem consequências estruturais importantes, já que o colesterol, ao permitir a organização das regiões próximas aos grupos polares, facilitaria a organização de plataformas estruturadas e funcionais como são os *lipid rafts*. Quando o colesterol se localiza contíguo às cadeias de hidrocarboneto de um fosfolipídio, o anel esteroide de geometria planar restringe a flexibilidade conformacional desta cadeia (diminui a sua movimentação por agitação térmica), ordenando-a. Em outras palavras, a presença do colesterol nas membranas permite uma diminuição das reorientações moleculares dos fosfolipídios, particularmente a movimentação das cadeias de hidrocarboneto, sem afetar a sua difusão lateral. Com isso, as membranas se apresentam à temperatura fisiológica em um estado chamado de líquido ordenado (L_o), isto é, encontram-se tão ordenadas quanto no estado sólido, porém mantendo a natureza fluida das membranas biológicas³⁶. As consequências funcionais que desse fato decorrem precisam de uma atenção particular. A incorporação de colesterol nas membranas diminui a fluidez destas, gerando a consequente organização estrutural, da qual decorre a especialização de funções. Dentre essas se encontra a localização nas membranas biológicas de proteínas que medeiam diversos processos, podendo ser enzimas, canais, transportadores, receptores, entre outros. Por sua vez, as proteínas executam mudanças de conformação para desenvolver seus efeitos biológicos. Desta maneira, surge um paradoxo a respeito do conteúdo de colesterol de membrana: na ausência de colesterol na membrana, não é possível a organização estrutural desta e consequentemente há um impacto negativo sobre a localização de proteínas na membrana. Todavia, um excesso de colesterol a tornaria rígida ao ponto de diminuir o volume livre de membrana que as proteínas requerem para executar mudanças conformacionais para a sua atividade biológica. De maneira interessante, o colesterol nas membranas biológicas adquire uma organização específica que permite a organização estrutural e também temporal da membrana plasmática, através da formação de microdomínios ricos em colesterol, nos quais acontecem diversos eventos biológicos, dentre eles, a secreção. Essas estruturas correspondem aos chamados *lipid rafts*.

A descrição original feita por Singer e Nicholson do modelo estrutural da membrana estabelecia a organização das membranas como um mosaico fluido³⁷. Todavia, pela alta especificidade de fenômenos que nas membranas biológicas

acontecem, a natureza destas segue um padrão arranjado e definido, o que tem levado a propor que a sua natureza é mais próxima a um mosaico que a uma matriz fluida³⁸. Nesse sentido, inúmeras evidências estabelecem os *lipid rafts* como microdomínios funcionais de membrana, sendo uma de suas características fundamentais a presença do colesterol como elemento organizador³⁹. Porém, a sua composição lipídica e proteica é heterogênea. Esses microdomínios de membrana, que pelo seu tamanho (10-150nm)⁴⁰ correspondem a estruturas nanoscópicas, foram originalmente descritos como regiões resistentes a detergentes, DRMs (do inglês *detergent resistant membranes*), de acordo com a estratégia de isolamento baseada em detergentes como o Triton X-100. Cabe destacar que, como consequência das diferentes estratégias que têm sido utilizadas para detectar microdomínios de membrana, os *lipid rafts* têm recebido diferentes definições: membranas resistentes a detergentes, *clusters* de proteínas e lipídios, pela sua detecção através de técnicas como FRET (do inglês *fluorescence resonance energy transfer*), entre outras. No presente texto nos referiremos aos microdomínios de membrana como *lipid rafts* ou microdomínios de membrana. Em termos de composição, embora heterogênea, existem certos elementos comuns. Os *lipid rafts* são microdomínios de membrana ricos em esfingolipídios e fosfolipídios de cadeia saturada junto com a presença do colesterol, constituindo estruturas altamente dinâmicas. Dessa maneira, o fato de possuírem uma alta quantidade de fosfolipídios com cadeia de hidrocarboneto saturada permite predizer que serão regiões de membrana com um alto ordenamento molecular, fato ao qual se soma a presença organizadora do colesterol citada mais acima. Tudo isso confere aos *lipid rafts* características estruturais únicas que permitem a segregação de fenômenos biológicos. A manipulação exclusiva de componentes lipídicos dos *lipid rafts* conduz a alterações funcionais significativas. A remoção de colesterol da membrana plasmática através da utilização de metil- β -ciclodextrina, M β CD, molécula oligossacarídica cíclica que liga-se ao colesterol com alta afinidade, traz consigo alterações em fenômenos de transdução de sinais⁴¹ e também de secreção, que serão abordados na seção seguinte. Por outro lado, a incorporação de um excesso de colesterol produz semelhantes efeitos negativos. De maneira interessante, o enriquecimento de membranas biológicas em fosfolipídios de cadeias poliinsaturadas também tem um efeito desestabilizador de *lipid rafts*⁴².

Os aspectos estruturais que há por trás dos *lipid rafts* permitem conjecturar os diversos efeitos funcionais que traria a desestabilização ou perda da estrutura dos microdomínios de membrana. O fenômeno da secreção acontece justamente na membrana plasmática assistida por uma complexa maquinaria secretora constituída de numerosas proteínas que provavelmente precisam de um arranjo temporal e espacial característico. Nesse sentido, o processo da secreção de insulina não se encontra alheio ao papel que o colesterol tem como modulador de funções de membrana.

1.4.2 Colesterol como modulador da secreção de insulina

O processo de secreção de insulina tem se mostrado ser suscetível ao conteúdo celular de colesterol. Através de estudos que utilizam M β CD para sequestrar colesterol de membrana com alta afinidade, tem se mostrado uma diminuição na localização de proteínas como syntaxina 1 e SNAP25 na membrana plasmática, o que afeta negativamente a secreção⁴³. Estudos de secreção através da medida de capacitância de membrana estabelecem que a queda do colesterol celular reduz o aumento da capacitância evocado por um trem de estímulos despolarizantes, isto é, uma redução nos eventos de fusão de grânulo com a membrana plasmática⁴⁴.

Apesar da crescente evidência na literatura que propõe a participação de microdomínios de membrana em diversos fenômenos biológicos, o grau de envolvimento que a secreção de hormônios tem com esses microdomínios, particularmente a liberação de insulina, ainda apresenta elementos desconhecidos. Existem evidências na literatura que propõem que a redução do conteúdo celular de colesterol reduz a secreção de insulina, tanto em célula beta quanto em linhagem de célula beta^{44, 19}. Todavia, e pela complexidade da maquinaria de secreção, não há um consenso que estabeleça se tal efeito negativo na secreção se deva à desorganização do complexo SNARE e de proteínas acessórias em *lipid rafts*, ou a um papel direto do colesterol na função de certas proteínas, ou ainda a ordenamentos moleculares da membrana plasmática em torno de proteínas transmembrana envolvidas na secreção, dentre outras possibilidades. Todavia, e tal como fosse proposto mais acima, um excesso de colesterol também traz efeitos prejudiciais na secreção de insulina. Tem se mostrado que em modelos de animais

com deleção de genes que codificam para transportadores de colesterol, particularmente os *knock out* para o transportador ABCA1 e LDLR, o aumento da concentração celular de colesterol também reduz os eventos de fusão de grânulo à membrana e, finalmente, a secreção de insulina^{45, 46}. Essas evidências abrem diversos questionamentos, dentre os quais cabe destacar o fato de que aparentemente existe uma concentração ideal de colesterol de membrana que permite que esta se encontre em um estado físico tal que permita uma organização da membrana, sem torná-la suficientemente rígida para impedir eventos de fusão. Para tanto, propomos a estudar não somente aspectos funcionais da célula beta, mas também explorar propriedades físicas de membrana, como sua fluidez, através de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons, e distribuição de proteínas chaves para a secreção em diferentes domínios de membrana. É por isso que o presente trabalho visou, dentre outros objetivos, entender como a queda celular de colesterol, como consequência do efeito das estatinas, traz consequências estruturais e funcionais à membrana plasmática de células secretoras de insulina. Uma alternativa técnica de grande valor para entender mudanças na natureza biofísica da membrana é a ressonância paramagnética de elétrons. Os seus fundamentos e aplicações para os estudos de membranas serão abordados na seção seguinte.

1.5 EPR e isolamento de *lipid rafts* como estratégias para a análise estrutural da membrana plasmática de células secretoras

As membranas biológicas possuem características mecânicas, cuja manutenção tem um efeito nos fenômenos que nelas acontecem. Entre estas características se encontram a fluidez e rigidez da membrana. O colesterol, como elemento organizador de membrana, tem um efeito importante na existência e controle desses parâmetros. Nesse sentido, regiões de membrana ricas em colesterol, como os *lipid rafts*, possuirão características de maior rigidez, enquanto frações de membrana que coloquialmente chamaremos de “não-*lipid raft*”, terão uma fluidez maior que os microdomínios de membrana ricos em colesterol. Em consequência, a possibilidade de medir esses parâmetros confere informação valiosa a respeito do estado de ordem das membranas. Por sua vez, levando em conta que o colesterol é um constituinte importante para a organização da

membrana, o conhecimento da rigidez e fluidez desta provê informação do impacto que o colesterol teria sobre a organização da membrana da estrutura biológica em estudo, neste caso, células INS-1E, linhagem de célula beta pancreática de rato. Para medir esses parâmetros tem se utilizado a espectroscopia de ressonância de elétrons (EPR). Essa técnica permite, através da detecção de espécies radiculares localizadas em marcadores de membrana, estudar sua organização. Apesar do valor das informações que se podem extrair através de EPR, esta técnica não nos permite estudar o próprio *lipid raft*, de um ponto de vista do conteúdo de colesterol e da distribuição de proteínas residentes neles, razão pela qual, neste trabalho, além do estudo das membranas por EPR, também foram isoladas as frações de membrana, como estratégia de estudo de *lipid rafts*. Os aspectos técnicos por trás do EPR serão tratados na seção de Materiais e Métodos.

Experimentalmente existe controvérsia quanto às estratégias técnicas que estabeleçam com robustez a existência dos *lipid rafts* em tempo real e os fenômenos associados a eles. Todavia, há ferramentas que têm contribuído nessa área. Há evidências que estabelecem a possibilidade de obter imagens de *lipid rafts* através de técnicas de microscopia de alta resolução, como a microscopia NSOM (do inglês *near-field scanning optical microscopy*) que permite obter imagens em escala nanoscópica⁴⁷, resolução não obtida pela microscopia confocal. Porém, o isolamento de membranas resistentes a detergentes através de ultracentrifugação constitui a estratégia mais adequada para a caracterização bioquímica dos *lipid rafts*, podendo estabelecer o tipo e quantidade de proteínas residentes nestes domínios assim como o tipo de lipídios presentes. Nesse sentido, o procedimento tradicionalmente utilizado para isolar *lipid rafts* corresponde ao isolamento de membranas resistentes a detergentes, particularmente utilizando detergentes não-iônicos como Triton X-100. Após a desagregação de *pellets* de membranas, essas são tratadas com Triton X-100 que desagrega membranas não-*lipid raft* deixando os microdomínios de membranas ricos em colesterol íntegros, os quais, pelas suas características de densidade, flutuam em gradientes de sacarose em concentrações de entre 5-30%, podendo ser isolados para a sua caracterização. Por esse motivo, essa estratégia de separação diferencial de frações lipídicas de membrana por ultracentrifugação foi também utilizada no presente projeto para avaliar a integridade de microdomínios de

membrana em células INS-1E após tratamentos que diminuem o conteúdo celular de colesterol.

Apesar das evidências existentes na literatura sobre *lipid rafts*, o estudo da estruturação da maquinaria de secreção de insulina nestes microdomínios funcionais de membrana através de uma abordagem física e as implicações bioquímicas e funcionais são de importância substantiva para entender a dependência que o processo de secreção de insulina tem em relação ao colesterol.

1.5.1 Aspectos teóricos da espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons

A fluidez e rigidez de membrana são parâmetros dependentes do potencial organizador que o colesterol tem sobre a membrana. Para este fim tem sido utilizada a técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (EPR). Essa técnica foi desenvolvida nos anos 1940 e sua aplicação na área biomédica começou nos anos 1970. O princípio por trás da técnica baseia-se nas transições energéticas de um elétron desemparelhado que, ao ser submetido a um campo magnético externo e um feixe de micro-ondas, tem transições energéticas desde um estado de baixa energia para um de alta (**Figura 2A**)⁴⁸. Utilizando-se moléculas miméticas de fosfolipídios que contenham na sua estrutura grupos químicos que possuam uma espécie radicalar, isto é, um elétron desemparelhado, pode-se medir através de EPR o grau de interação que existe entre este elétron e o *momentum* magnético de núcleos atômicos próximos. O 5-DSA (ácido-5-doxilesteárico), que possui a espécie radical nitroxila no carbono 5 (**Figura 2B**), ao se inserir na membrana plasmática, está sujeito ao arranjo molecular existente nesta, isto é, ao grau de ordem da membrana.

A excitação do elétron desaparelhado da espécie radical nitroxila (*i.e.* distribuição do elétron desaparelhado da espécie radical nos níveis energéticos) é determinada também pela chamada interação hiperfina existente entre o elétron e os planos atômicos, neste caso, da nitroxila que, pela sua geometria simétrica, determina duas constantes de interação hiperfina que agem sobre o elétron desemparelhado⁴⁹. As interações hiperfinas são definidas como a interação magnética que acontece entre o *momentum* magnético de núcleos próximos à espécie radicalar e o elétron desaparelhado. No caso do radical nitroxila, ao ser submetido ao campo magnético externo do aparelho de EPR e ao feixe de

microondas, que permitem o *split* ou separação dos níveis energéticos e excitação do elétron, respectivamente, desde níveis energéticos basais, se obtêm um registro de três picos (**Figura 2C**). Os dois picos menores (marcados com * na **Figura 2C**) correspondem aos registros hiperfinos. A magnitude desses picos é dependente do grau de ordem presente na membrana da espécie a ser estudada. Nesse sentido, quanto maior for o grau de desordem nas membranas biológicas, maior será a agitação térmica das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios (incluindo o 5-DSA). Desta maneira, as interações hiperfinas no radical nitroxila serão maiores, determinando uma excitação maior do elétron desemparelhado pelo *momentum* magnético dos núcleos atômicos do radical nitroxila. Os registros da **Figura 2C** exemplificam as características que adquirem os registros segundo o grau de ordem da membrana. No entanto isso corresponde a uma aproximação qualitativa do status de características físicas da membrana plasmática. A partir dos perfis obtidos num registro de EPR é possível obter valores de fluidez da membrana em que foi incorporada a *probe*, nesse caso, o 5-DSA, e estabelecer quantitativamente mudanças nas interações hiperfinas, como se explica na **Figura 2**.

Figura 2 - Princípio por trás do EPR como estratégia de medida de parâmetros físicos de membrana.

(A) Diagrama de transições de elétron. Setas grossas, *spin* eletrônico; setas finas, *split* de elétrons em sub-níveis energéticos; setas pontilhadas, transições eletrônicas possíveis; β , nível de baixa energia; α , nível de alta energia. (B) Estrutura do ácido-5-doxilesteárico (5-DSA), lipídio com um radical nitroxila no carbono 5 de uma cadeia de hidrocarboneto. (C) Arranjos de membrana dependentes de conteúdo de colesterol e registros representativos. Verde, 5-DSA; amarelo, colesterol. Os registros correspondem a estudos de membrana plasmática de células INS-1E, obtidos durante o presente trabalho. Registro esquerdo, células INS-1E tratadas com M β CD 1mM 1h; registro direito, células INS-1E sem tratamento. *mostra os picos de interações hiperfinas. (D) Diagrama de registro de EPR do 5-DSA, onde se indica como são obtidos os parâmetros $2T_{\parallel}$ e $2T_{\perp}$ a partir do registro observado. + corresponde à região dos picos hiperfinos externos a partir da qual se faz a medida do $2T_{\parallel}$, *indica os pontos a partir dos quais se medem os picos hiperfinos internos, dando a medida de $2T_{\perp}$, em gauss. Figura modificada de ⁵⁰.

A partir dos registros obtidos, é possível extrair informações sobre o estado de fluidez da membrana utilizando expressões matemáticas que incorporam parâmetros de ordem que definem os picos hiperfinos. No registro que se observa na **Figura 2D**, que corresponde ao registro de EPR do 5-DSA em membranas de hemácias, se observam os dois picos já descritos que correspondem às interações hiperfinas. Os parâmetros de ordem anteriormente descritos, também chamados de $2T_{\parallel}$ e $2T_{\perp}$, são incorporados numa expressão matemática que, para o caso do 5-DSA^{50, 51} corresponde a:

$$S = \frac{T_{//} - T_{\perp} - C}{T_{//} + 2T_{\perp} + 2C} \times 1,73$$

$$T_{//} + 2T_{\perp} + 2C$$

$$C = 1,4 - 0,053(T_{//} - T_{\perp})$$

onde S corresponde a um parâmetro de ordem. O $2T_{//}$ corresponde ao *splitting* da interação hiperfina externa (picos hiperfinos externos do sinal, **Fig. 2D**, marcado com +). O símbolo // denota que essa interação hiperfina surge como consequência da interação hiperfina do *momentum* magnético de núcleos paralelos ao eixo Z da molécula por onde é direcionado o campo magnético externo (do aparelho de EPR). O $2T_{\perp}$ corresponde ao *splitting* da interação hiperfina interna (picos hiperfinos internos do sinal, **Fig. 2D**, marcado com *). O símbolo $\perp$ denota que essa interação hiperfina acontece como consequência da interação do *momentum* magnético de núcleos perpendiculares ao eixo Z da molécula por onde é direcionado o campo magnético externo. Dessa maneira é possível obter dados referentes ao estado de fluidez da membrana da amostra estudada. Os parâmetros h_{-1}/h_0 , indicados na **Figura 2D**, proveem informações adicionais a respeito da condição dos parâmetros mecânicos da membrana. Particularmente, esses parâmetros fornecem informação referente à velocidade de rotação da *probe*, no nosso caso o 5-DSA, em torno do seu próprio eixo. Nesse sentido, um menor tempo de rotação observável do 5-DSA em uma amostra significa que o entorno molecular de membrana em que o marcador se encontra possui uma estrutura menos arranjada, mais fluida, permitindo uma maior agitação das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios, dentre eles o 5-DSA^{51, 52}.

Por sua vez, a partir dos mesmos registros de EPR podem ser obtidos parâmetros da movimentação do 5-DSA, a partir dos quais se obtêm o parâmetro de movimento τ_{cor} ou tempo de correlação rotacional. Esse parâmetro indica o tempo de movimentação da *probe* utilizada, o que reflete a movimentação molecular da membrana plasmática, isto é, a sua fluidez. Dito valor fica definido pelos valores de h_0 , que corresponde à altura do pico central do registro de EPR, e ao h_{-1} que corresponde à altura do pico hiperfino, tal como se mostra na **Figura 2D**. Em termos matemáticos, o tempo de correlação rotacional fica definido segundo a expressão seguinte^{53, 54}

$$\tau_0 = K \times W_0 (h_0/h_{-1} - 1)$$

$$K = 6,5 \times 10^{-10} \text{ sec}$$

Dessa maneira é possível deduzir características físicas da membrana plasmática, as quais são suscetíveis a mudanças dependendo, entre outros fatores, do conteúdo de lipídios de cadeia saturada e de colesterol, os quais permitem arranjos mais organizados e estruturados das membranas celulares.

1.6 Secreção de insulina e rota de biossíntese de colesterol: dependência bivalente ou multifatorial? Por que utilizar a célula beta como modelo de estudo de secreção e sua relação com a biossíntese de colesterol?

O intuito original do presente projeto correspondia à avaliação dos efeitos que teria na secreção de insulina uma diminuição do conteúdo de colesterol, desde o ponto de vista da organização de funções secretoras ao nível da membrana plasmática. Todavia, ao utilizar uma ferramenta farmacológica que é utilizada na clínica em pacientes com diabetes mellito do tipo II, as estatinas, foi observado que este tipo de fármaco inibe também a formação dos intermediários de biossíntese de colesterol, colocando assim mais um fator a ser considerado no estudo. De maneira interessante, o fenômeno da secreção na célula beta pancreática é dependente também desses intermediários de biossíntese, tal como foi explicitado na seção 1.3.2. Dessa maneira, a célula beta representou um modelo interessante para estudar o envolvimento da via de biossíntese de colesterol no fenômeno secretório desde dois pontos de vista, a saber: o colesterol de membrana como organizador estrutural e funcional e a isoprenilação de proteínas.

Cabe sinalizar que, embora esses dois pontos de vista sejam críticos para a função secretora, existem outros mecanismos celulares em que o colesterol e derivados da sua biossíntese intervêm. Dessa maneira, apesar de que a nossa abordagem consistiu na avaliação de dois elementos fundamentais para a secreção já explicitados, isto não retira importância do fato de que a interrelação existente entre a secreção de insulina e a biossíntese de colesterol é um fenômeno multifatorial.

Para tanto, propomos como hipótese que a secreção de insulina é modulada por intermediários da biossíntese de colesterol assim como pelo arranjo em microdomínios de membrana ricos em colesterol, os quais são necessários para a eficiente secreção de insulina.

2 OBJETIVOS

O fenômeno secretório, que acontece através da fusão da membrana de grânulo com a membrana plasmática celular, depende da organização estrutural e funcional da membrana plasmática, o que depende de maneira importante do colesterol. No entanto, no caso particular da secreção de insulina, o processo parece ser dependente também de intermediários da biossíntese de colesterol. Por sua vez, as estatinas são fármacos que interferem tanto na síntese de colesterol quanto a dos seus intermediários. Considerando esses antecedentes, o objetivo do presente projeto foi estudar, utilizando as estatinas como ferramenta experimental de redução do colesterol, a contribuição do colesterol e dos seus intermediários de biossíntese no processo da secreção de insulina em células beta pancreáticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de Células

Células INS-1E de rato (passagens 80-90) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com glicose 11 mM, 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,05 mM de 2-mercaptoetanol. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida e CO₂ 5%. Para os estudos de EPR e de isolamento de microdomínios de membrana foram utilizadas células INS-1E de rato (passagens 53-60) gentilmente doadas pelo Professor Pierre Maechler (Université de Genève).

Isolamento de ilhotas de rato e camundongo

Ratos *Wistar* de 3 meses de idade foram tratados por 7 e 15 dias com SIM 5 mg/Kg/dia por gavagem (em carboximetil celulose como veículo). Ao final dos tratamentos os animais foram eutanasiados e isoladas as ilhotas pancreáticas após digestão do pâncreas com colagenase (0,68 mg/mL) Sigma (C9263) em tampão Hanks (em mM: NaCl 136, KCl 5,36, MgSO₄·7H₂O 0,81, NaHPO₄·12H₂O 0,3, KH₂PO₄ 0,44, CaCl₂·2H₂O 1,26, NaHCO₃ 4,17, pH 7,4). As ilhotas coletadas (5 por cada tubo de reação) foram estabilizadas por 30 min a 37°C em tampão Krebs (em mM: NaCl 115, NaHCO₃ 24, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1; BSA 0,1% pH 7,4) suplementado com glicose 5,6mM para logo serem tratadas com glicose 2,8, 5,6 e 16,7 mM durante 1 h a 37 °C com agitação. Após secreção se obteve o conteúdo total de insulina com tratamento de álcool-ácido (H₂O:CH₃CH₂OH:HCl 17:52:1). A insulina foi dosada por RIE. O mesmo protocolo de isolamento de ilhotas de rato foi utilizado pra camundongos C57BL/6 de 6 meses. As ilhotas isoladas foram submetidas a tratamento crônico com ZGA 20 µM durante 24 e 48 h em meio RPMI antes dos ensaios de secreção. Os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB-USP (protocolo registrado sob o nº005 nas folhas. 98 do livro 02).

Para os experimentos de secreção aguda foram utilizadas ilhotas de rato, assim como para os tratamentos crônicos dos animais com sinvastatina oral. Foi escolhido o rato considerando que as células INS-1E utilizadas no modelo *in vitro* correspondem a células beta de rato imortalizadas. No entanto, para tratamentos crônicos de cultura primária de ilhotas pancreáticas foram utilizadas ilhotas de

camundongos, considerando que, de acordo com experiência do nosso laboratório, no tratamento crônico em cultura primária de ilhotas de camundongo, o efeito das estatinas é mais evidente do que em modelo rato.

Tratamentos em cultura celular

As células foram tratadas por 2 h (tratamento agudo) ou por 24 h (tratamento crônico) com sinvastatina (SIM) 1 μ M (S6196 Sigma[®], St Luis, MO, USA) para o estudo do efeito na secreção de insulina, análise de conteúdo celular de colesterol, análise de *clusters* de *lipid rafts* por imunofluorescência, fluidez/rigidez de membrana, isolamento de microdomínios de membrana e quantificação de colesterol de membrana. A concentração de 1 μ M foi escolhida considerando que foi testada uma concentração menor, 0,01 μ M, a qual não gerou uma diminuição significativa da secreção de insulina (**Figura 3A**). Concentrações superiores a 1 μ M têm efeito citotóxico, da mesma maneira que incubações a 1 μ M em tempos superiores a 24 h.

Para estudar a importância dos grupos isoprenila na secreção de insulina, células INS-1E foram tratadas com o inibidor da esqualeno sintase (de maneira a inibir a síntese de colesterol após as reações de síntese dos grupos isoprenila, sem afetar o conteúdo celular destes), o ácido zaragózico, ZGA (Sigma[®] Z2626) 20 μ M. Essa concentração foi escolhida após uma curva dose resposta utilizando 0,5 μ M, 5 μ M e 20 μ M. 5 μ M foi a concentração utilizada previamente em cultura primária de neurônios²⁴. Somente a concentração de 20 μ M teve um efeito significativo de inibição da secreção de insulina.

Com o objetivo de estudar a participação do grupo isoprenila geranilgeranil pirofosfato, foi utilizado o inibidor da geranilgeranil transferase I, GGTi (Sigma[®] GGTI-2133) 10 μ M durante 2 h, e o geranilgeranil pirofosfato, GGPP (Sigma[®] G6025) 20 μ M suplementado no meio de cultura durante 24h. As concentrações de GGTi e GGPP foram escolhidas com base em trabalhos anteriores¹⁹.

Células também foram tratadas 1 h com metil- β -ciclodextrina, MBCD (Sigma[®] C4555) 1 mM como controle de depleção de colesterol celular⁴⁴.

Para estudar a diferença entre os efeitos de uma estatina hidrofóbica (SIM) e uma hidrofílica, foi utilizada pravastatina (Sigma[®] P4498) (PRAV) 1 μ M 24 h para estudar por EPR efeitos na fluidez de membrana.

Para estudar a importância do colesterol na secreção de insulina, células INS-1E tratadas com ZGA 20 μM foram suplementadas com colesterol solúvel (CHOL) (Cholesterol-PEG 600, Sigma[®] C1145) 2 mM durante 4 h.

Secreção de insulina

Após os tratamentos em 4×10^5 células, a insulina secretada (secreção de insulina estimulada pela glicose GSIS, do inglês *glucose-stimulated insulin secretion*) foi dosada segundo o protocolo estabelecido na literatura⁵⁵. Brevemente, 4×10^5 células INS-1E foram sub-cultivadas em cada poço de uma placa de 24. Após 2 dias de subcultura, as células foram submetidas aos tratamentos descritos acima. No caso dos tratamentos agudos com SIM e ZGA, estes foram feitos no período de privação de glicose descrito a seguir. O meio de cultura foi eliminado e as células lavadas com tampão Krebs Henseleit (em mM: NaCl 115, NaHCO₃ 24, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, pH 7,4 com CO₂). Em seguida as células foram submetidas a 2h de privação de glicose em tampão Krebs sem glicose. Finalmente, as células foram incubadas durante 2 h em tampão Krebs suplementado com BSA 0,2% e glicose 2,8 mM, no tratamento basal, e 16,7 mM no tratamento estímulo. Após a coleta do sobrenadante, o conteúdo total de insulina foi extraído com solução de álcool-ácido. A insulina secretada (sobrenadante) e o conteúdo total de insulina foram dosados por RIE.

Dosagem de colesterol total

Para a quantificação de conteúdo de colesterol nas células INS-1E, 10×10^6 células foram cultivadas em meio RPMI 1640 durante 24 h com sinvastatina 0,01 μM , 0,1 μM e 1 μM . Também foi estudado o efeito do ZGA no conteúdo total de colesterol, para o qual 10×10^6 células foram tratadas com ZGA 0,5 μM , 5 μM e 20 μM . Após o tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS 1X (em mM: NaCl 136,8, KCl 2,7, KH₂PO₄ 0,9, Na₂HPO₄·7H₂O 6,4) e centrifugadas a 2000 rpm (1.625 g Centrífuga Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) por 5 min. O *pellet* foi ressuspensionado em 350 μL de metanol e 700 μL de clorofórmio e agitado com *vortex*; agregou-se 200 μL de água e, após centrifugação a 10.000 rpm (10.621g Centrífuga Eppendorf 5417R) por 5min, a fase orgânica foi coletada. O solvente foi evaporado em *speedvac* por 45 min a 40 °C. O *pellet* foi solubilizado em 50 μL de etanol a 37 °C por 10 min com agitação. O conteúdo de colesterol foi dosado com teste

colorimétrico Bioclin® Colesterol Monoreagente K083 (Belo Horizonte, MG, Brasil). As leituras das absorbâncias foram obtidas a 500 nm.

Deteção de lipid rafts em membrana plasmática

Para a detecção dos *lipid rafts* em células INS-1E, foi utilizado o protocolo do kit Vybrant® Alexa Fluor 594 Lipid Raft Labeling Kit da Invitrogen™ e foram seguidas as recomendações do fabricante. Essa estratégia experimental utiliza a toxina B de cólera conjugada com o fluoróforo, a qual se une ao gangliosídeo GM1 presente na membrana plasmática, onde está arranjado de tal maneira que se localiza majoritariamente nos *lipid rafts*. Para isso, as células INS-1E foram aderidas em lamínulas de vidro tratadas com poli-L-lisina (Sigma). Os *lipid rafts* foram observados no microscópio de epifluorescência Carl Zeiss Observer Z1 (Oberkochen, Germany) utilizando objetiva 40X e a banda de excitação de 488 nm de um laser de argônio. A fluorescência emitida foi filtrada a 590 nm e processada digitalmente utilizando-se o programa ImageJ. A fluorescência de *clusters* de *lipid rafts* foi quantificada como a média da intensidade de fluorescência da membrana plasmática, identificadas como regiões de interesse, ROI (do inglês *regions of interest*).

Análise de fluidez da membrana plasmática através de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons, EPR.

A fluidez da membrana plasmática das células INS-1E após o tratamento com cada droga foi medida através de uma molécula marcada com um grupo químico que contém um elétron desaparelhado; através do EPR, medem-se mudanças na movimentação trópica do *spin* do elétron em questão. Foi utilizado o ácido-5-doxilesteárico (5-DSA) (derivado do ácido esteárico), que contém no carbono 5 da cadeia de hidrocarboneto a espécie radical nitroxila, que contém um elétron desaparelhado. Esse marcador, que se insere no folheto extracelular da bicamada lipídica, permite determinar a fluidez local de membrana na região dos grupos polares dos fosfolipídios⁵⁰. 20 µL de suspensão de células INS-1E (5.000 células/µL) (1 mM de concentração final de 5-DSA) foram analisadas após cada tratamento. As amostras de células marcadas com 5-DSA foram carregadas em capilares de 50 µL Magnettech® e analisadas no espectrômetro Magnettech® *MiniScope MS200 benchtop spectrometer* (Berlin, Germany). As condições utilizadas para os registros de EPR foram as seguintes (por conveniência, as condições são descritas em inglês): *microwave power, 7 mW; modulation amplitude, 2 G; modulation frequency,*

100 kHz; sweep width, 146.21 G centered at 3357.90 G; scan rate, 7.31 G/s; cada espectro representa a média de 10 scans. Do espectro de 5-DSA um parâmetro de ordem (S) foi calculado a partir do *splitting* hiperfino externo e interno $2T_{||}$ e $2T_{\perp}$, respectivamente⁴⁸.

Isolamento de membranas resistentes a detergentes (DRMs) de células INS-1E através de ultracentrifugação

O isolamento das DRMs foi feito segundo protocolo publicado anteriormente⁵⁶ com as modificações descritas a seguir. Células INS-1E previamente tratadas (Controle, SIM 1 μ M 2 h, 24 h e MBCD 1 mM 1 h) foram homogeneizadas através de 24 passagens por uma seringa com agulha de 23-gauge em 500 μ L de tampão HES gelado (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 250 mM sacarose, pH 7,4) e centrifugadas a 245.000 g durante 90 min a 4 °C em tubos de 2 mL em uma ultracentrífuga Beckman Coulter Optima MAX-TL (Brea, CA, USA). Os *pellets* de membranas foram resuspendidos em 200 μ L de tampão MBS esfriado em gelo (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5) suplementado com Triton X-100 1% e incubadas por 20 min a 4 °C. As suspensões de membranas foram homogeneizadas através de 24 passagens por uma seringa com agulha de 23-gauge e suplementadas com 200 μ L de sacarose 90% (p/v) preparados em tampão MBS; 500 μ g de proteína foram carregados por coluna, como critério de normalização, já que não existem proteínas residentes em todas as frações de membrana que possam ser utilizadas como controle de carregamento. A mistura anterior foi coberta com 1,1 mL sacarose 35 % em tampão MBS e finalmente coberta com 700 μ L de sacarose 5% em tampão MBS. Os gradientes foram centrifugados a 240.000 g durante 18 h a 4 °C. Foram coletadas 11 frações de 200 μ L desde o topo do tubo (fração 1) até o fundo deste (fração 11). Todos os tampões foram suplementados com inibidores de protease.

Western Blot

As proteínas presentes em cada fração de membrana, após o isolamento das DRMs, foram resolvidas em gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras (SDS) para então serem transferidas a membranas de PVDF com poro de 0.45 μ m (Immobilon[®]-P, Millipore[™], Billerica, MA, USA)). Como critério de normalização foram carregados 25 μ L de amostra de cada fração e, no caso do homogenado total (HT) foram carregados 5 μ g de proteína. Para estudar a localização de proteínas da maquinaria de secreção em *lipid rafts*, as membranas foram incubadas com

anticorpos anti subunidade $\alpha 2$ do $\text{Ca}_v1.2$ (Abcam[®] ab2864, Cambridge, UK) e anti Sintaxina 1A (Abcam[®] ab41351); como controle de proteínas localizadas em *lipid rafts*, as membranas foram incubadas com anticorpo anti flotilina 1 (Abcam[®] ab50671). Com o objetivo de estudar também a presença de *lipid rafts* de outras estruturas celulares, foi marcada a proteína carboxipeptidase E, pró-hormônio convertase localizada em *lipid rafts* de *trans*-Golgi e de grânulos de insulina; com esse propósito foi utilizado o anticorpo anti carboxipeptidase H (nome alternativo da isoforma E) (Abcam[®] ab11044). Todos os anticorpos primários foram utilizados na diluição de 1/1000. Após uma hora de incubação com anticorpo secundário conjugado com a enzima HRP, as proteínas foram visualizadas através de ECL Lumigen TMA-6[®]. A análise semiquantitativa das proteínas foi feita através de densitometria das bandas com o programa ImageJ (NIH, Wayne Rasband).

Quantificação de colesterol de membrana

O conteúdo de colesterol das frações de membrana obtidas das células INS-1E submetidas aos tratamentos citados acima foi quantificado através do kit *Amplex[®] Red cholesterol assay kit, Invitrogen[™] I* (Carlsbad, CA, USA), seguindo as especificações do fabricante.

Eletrofisiologia

Os experimentos de eletrofisiologia foram realizados em células primárias de rato obtidas através da dispersão de ilhotas pancreáticas incubadas por 11 min a 37°C em solução livre de cálcio. Após recuperação do processo de dispersão por 24 h em meio de cultura RPMI contendo 7 mM de glicose, as células foram tratadas com SIM 1 μM por 2 ou 24 h. Correntes *whole-cell* e a exocitose em tempo real foram registradas empregando um amplificador de *patch-clamp* EPC-10 e o programa Pulsemaster (HEKA electronics, Chester, NS, Canada). A exocitose foi registrada como mudanças na capacitância de membrana usando a configuração de *standard whole-cell*. O meio extracelular continha (em mM): 118 NaCl, 20 cloreto de tetraetilamônio (TEA, para bloquear as correntes de K^+ dependentes de voltagem), 5.6 KCl, 2.6 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 5 glicose, e 5 HEPES (pH 7.4 com NaOH). A solução de pipeta continha (em mM): 125 Cs-glutamato, 10 NaCl, 10 CsCl, 1 MgCl_2 , 0.05 EGTA, 3 Mg-ATP, e 10 HEPES (pH 7.15 com CsOH). Foram utilizados eletrodos com resistência de pipeta entre 3 e 7 M Ω quando preenchidas com a solução

intracelular. A exocitose foi detectada como mudanças na capacitância de membrana usando a função *lock-in* do programa *Pulsemaster* que comanda o amplificador. A exocitose foi deflagrada através de um trem de despolarizações de 500 ms cada, de -70 a 0 mV, aplicadas numa frequência de 1 Hz. Esses experimentos foram realizados pelo Dr. Eduardo Rebelato Lopes de Oliveira.

Estatística

ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey* foi utilizada para analisar os experimentos de secreção de insulina utilizando GGTi, GGPP, e GGPP/SIM em alta glicose (16,7 mM), nas análises de conteúdo de colesterol total e de membrana, na análise da marcação de *lipid rafts* através de imunofluorescência e nos experimentos de EPR. ANOVA de duas vias com pós teste de *Bonferroni* foi utilizada para analisar a secreção de insulina após os tratamentos com SIM, ZGA, SIM/CHOL, tanto em células INS-1E, quanto em ilhotas de ratos. A significância estatística foi estabelecida sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. As análises foram feitas no programa *Graph Pad Prism 5.0*.

4 RESULTADOS

4.1 O tratamento agudo (2h) com sinvastatina, mas não com ácido zaragózico, diminui a secreção de insulina estimulada pela glicose sem afetar o conteúdo celular de colesterol nem o conteúdo total de insulina

O intuito original do presente projeto correspondia à avaliação dos efeitos que a diminuição do colesterol teria sobre a GSIS. Nesse sentido, utilizando estatinas, acreditávamos que todo efeito na GSIS seria atribuível a efeitos ao nível da membrana plasmática como consequência da diminuição do conteúdo de colesterol. Todavia, o tratamento agudo com sinvastatina 1 μ M resultou na inibição da GSIS sem nenhum efeito no conteúdo total de colesterol (**Figura 3A, 3B**). De maneira interessante, esse efeito acontece sem uma mudança significativa no conteúdo total de insulina (**Figura 3C**). Ademais, o tratamento de ilhotas isoladas de rato com SIM durante 2 h também tem um efeito inibitório sobre a GSIS (**Figura 4**). Como consequência de ser um evento independente do conteúdo de colesterol, e sabendo que as estatinas inibem a formação de outros intermediários da biossíntese de colesterol que apresentam função biológica, utilizamos o ácido zaragózico com o intuito de inibir a formação de colesterol sem inibir a síntese de farnesil pirofosfato FPP (**Figura 1**). O tratamento agudo com ZGA não teve nenhum efeito inibitório sobre a GSIS, nem no conteúdo total de insulina (**Figura 5A, B**). Essas evidências apontam três informações relevantes: 1) a inibição da biossíntese de intermediários do colesterol estabelece a importância biológica dessas moléculas na GSIS, 2) dentre os efeitos pleiotrópicos que caracterizam as estatinas, a inibição da expressão de insulina não foi observada e 3) o tratamento de 2 h, tanto com SIM quanto com ZGA, não é um tempo suficiente para permitir um efluxo de colesterol celular que garantisse uma significativa diminuição do esterol nas células INS-1E. Esses resultados sugerem que moléculas intermediárias da biossíntese de colesterol têm um envolvimento importante na GSIS.

Figura 3 - O tratamento agudo (2 h) com SIM inibe a GSIS sem afetar o conteúdo celular de colesterol e a síntese de insulina

(A) Secreção de insulina após tratamento com SIM ($n = 6$); $*p < 0,05$ (ANOVA de duas vias). (B) Conteúdo celular de colesterol. (C) Conteúdo total de insulina. Barras brancas, glicose 2,8 mM; barras pretas, glicose 16,7 mM.

Figura 4 - O tratamento agudo (2 h) com SIM inibe a GSIS em ilhotas pancreáticas de rato

Secreção de insulina de ilhotas pancreáticas de rato após tratamento com SIM (n = 4); *p<0,05 (ANOVA de duas vias). Barras brancas, glicose 2,8 mM; barras cinza, glicose 5,6 mM; barras pretas, glicose 16,7 mM.

Figura 5 – O tratamento agudo (2 h) com ZGA não afeta a GSIS. O conteúdo total de insulina permanece sem alterações

(A) Secreção de insulina estimulada pela glicose em células tratadas com ZGA durante 2 h ($n = 6$) (ANOVA de duas vias). (B) Conteúdo total de insulina em células tratadas durante 2 h com ZGA ($n = 4$). Barras brancas, glicose 2,8 mM, barras pretas, glicose 16,7 mM.

4.2 O tratamento agudo com sinvastatina inibe a secreção de insulina através de um mecanismo dependente de geranylgeranilação de proteínas

Uma vez que o tratamento com SIM inibiu a GSIS sem alterações do conteúdo celular de colesterol, e o ZGA, por sua vez, não inibiu a secreção de insulina estimulada pela glicose, foi explorada a possibilidade da inibição da formação de grupos de natureza isoprenila, particularmente do geranylgeranil pirofosfato, por ser o responsável por esse efeito inibitório da SIM. Para tanto foram utilizadas duas estratégias farmacológicas: a inibição da geranylgeranil transferase do tipo I (GGTi) e o carregamento das células com geranylgeranilpirofosfato (GGPP) prévio ao tratamento com SIM. Quando as células INS-1E foram tratadas agudamente com GGTi 10 μ M foi observada a inibição da GSIS em níveis semelhantes aos obtidos após o tratamento agudo com SIM 1 μ M (**Figura 6**). Quando as células foram tratadas durante 24 h com GGPP e logo desafiadas com SIM durante 2 h, foi observada a prevenção do efeito inibitório do tratamento agudo da estatina. Se bem que é certo que no processo de secreção de insulina intervêm grupos isoprenila do tipo farnesil pirofosfato e geranylgeranil pirofosfato, a recuperação observada após o pré-tratamento com GGPP permite propor que a inibição da GSIS após o tratamento agudo com SIM aconteceria através de um mecanismo dependente da isoprenilação de proteínas, principalmente geranylgeranilação, e independente de colesterol.

Figura 6 – O tratamento agudo com SIM inibe a GSIS através da inibição da geranilgeranilação de proteínas

As barras brancas correspondem a estímulo com glicose 2.8 mM e as barras pretas a tratamento com glicose 16,7 mM (n = 4) (ANOVA de uma via). ** p<0,05, *** p<0,001 versus controle (16,7 mM glicose), § p<0,05 versus SIM 1 μM (16,7 mM glicose).

4.3 Os tratamentos crônicos (24 h) com sinvastatina e ácido zaragózico diminuem a secreção de insulina estimulada pela glicose, reduzindo o conteúdo celular de colesterol

Uma vez que o intuito original do trabalho correspondia à avaliação dos efeitos, no nível de membrana, que uma redução do conteúdo de colesterol teria sobre a função secretória da célula beta, foram feitos tratamentos crônicos com SIM, ZGA e com M β CD (agudamente) como controle positivo. Após 24 h de tratamento com SIM foi observada, da mesma maneira que no tratamento agudo, a inibição da secreção de insulina estimulada pela glicose, junto com uma redução significativa do conteúdo celular de colesterol, semelhante à observada após o tratamento com M β CD (**Figura 7A, B**).

Esses resultados permitem, *a priori*, correlacionar a redução do conteúdo de colesterol celular com a inibição da secreção de insulina; efeitos ao nível da expressão de insulina não são considerados já que o conteúdo total do hormônio permanece inalterado (**Figura 7C**). Todavia, de acordo com os resultados anteriores, a inibição da biossíntese de colesterol com sinvastatina também reduz a formação de intermediários biologicamente ativos, particularmente geranylgeranilpirofosfato. Nesse sentido, é intuitivo pensar que o efeito observado na **Figura 7A** pode ser a soma da diminuição da geranylgeranilação de proteínas e da redução do conteúdo de colesterol.

Para esclarecer o papel exclusivo da diminuição do conteúdo celular (e de membrana) de colesterol na GSIS foi feito o tratamento crônico com ZGA, observando-se uma diminuição da GSIS com uma redução do conteúdo celular de colesterol (**Figura 8A, B**), sem alterações no conteúdo total de insulina (**Figura 8C**). Uma vez que o ZGA inibe a formação de colesterol sem inibir a síntese de intermediários de natureza isoprenila, esses resultados permitem propor que a redução exclusivamente do colesterol também leva à inibição da GSIS.

De maneira interessante, já que a inibição da GSIS observada após o tratamento crônico com ZGA é quantitativamente semelhante à observada após o tratamento crônico com SIM, é evidente que neste último caso não acontece um efeito aditivo dos efeitos da redução da isoprenilação (particularmente, geranylgeranilação) de proteínas com os da redução do conteúdo de colesterol. Isto faz sentido à luz do raciocínio feito a partir dos efeitos no nível da membrana: se a diminuição do conteúdo celular de colesterol afeta a organização estrutural e

funcional da membrana, sem importar se a célula se encontra com os eventos celulares que dependem da isoprenilação afetados (*i. e.* tráfego de grânulos à membrana), o evento final da secreção, isto é, fusão do grânulo com a membrana plasmática, não acontecerá apropriadamente. Isso será discutido com maior profundidade na discussão.

O envolvimento do conteúdo de colesterol na regulação da GSIS é ubíquo, sendo a organização da membrana plasmática um aspecto crítico para a função secretória. Para tanto, com o intuito de correlacionar a consequência funcional observada que a redução do colesterol traz aos aspectos estruturais de membrana, foi feita a marcação por imunofluorescência de agregados ou *clusters* de *lipid rafts*. A marcação com toxina B de cólera, que se liga ao gangliosídeo GM1 que se encontra na membrana e principalmente em *lipid rafts*, se mostra na **Figura 9**. Embora os dados careçam de uma componente quantitativa, qualitativamente permitem observar uma aparente mudança no padrão de marcação na membrana após os tratamentos que reduzem significativamente o conteúdo celular de colesterol. Uma análise semi-quantitativa da intensidade de fluorescência da membrana (**Figura 9B**) mostra a redução na intensidade da marcação de membrana, devida à redução da formação de *clusters* de *lipid rafts* depois dos tratamentos com SIM 24 h e M β CD 1 h. Essas evidências, em conjunto, sugerem que a inibição aguda da biossíntese de colesterol inibe a secreção de insulina através de uma via independente do colesterol e dependente dos grupos isoprenila, enquanto que a inibição crônica da biossíntese de colesterol pode inibir a secreção de insulina por mecanismos que são dependentes do conteúdo de colesterol de membrana, particularmente da organização de *lipid rafts*.

Figura 7 – O tratamento crônico (24 h) com SIM inibe a GSIS e reduz significativamente o conteúdo celular de colesterol

(A) Diminuição da GSIS em células INS-1E após tratamento crônico (24 h) com SIM (n = 4); **p < 0,01 ANOVA de duas vias. Barras brancas, glicose 2,8 mM; barras pretas, glicose 16,7 mM. (B) Redução do conteúdo celular de colesterol (n = 3); *p < 0,05, **P < 0,01, ANOVA de uma via. (C) Conteúdo total de insulina (n = 4).

Figura 8 – O tratamento crônico (24 h) com ZGA reduz significativamente o colesterol celular, inibindo a GSIS

(A) O tratamento crônico (24 h) com ZGA diminui a secreção de insulina (n = 5); *p<0,05, ANOVA de duas vias. Barras brancas, glicose 2,8 mM; barras pretas, glicose 16,7 mM. (B) Redução do conteúdo total de colesterol (n = 3); ***p<0,001 ANOVA de uma via. (C) Conteúdo total de insulina.

Figura 9 – A marcação de *clusters* de *lipid rafts* de membrana é afetada após tratamentos que reduzem significativamente o conteúdo de colesterol

(A)

(B)

(A) Marcação de *lipid rafts* no controle, células tratadas com SIM 2 h e 24 h e controle positivo de diminuição do colesterol celular, MβCD 1 h. (B) Fluorescência média da marcação de *lipid rafts* (30 ROIs de 3 experimentos independentes). * $p < 0,05$, ANOVA de uma via, pós teste de *Tukey*. Unidades arbitrárias (U. A) correspondem à soma dos valores de cinza de todos os pixels de cada ROI dividido pelo número de pixels (ImageJ User Guide, ImageJ/Fiji 1.46). Células INS-1E nas passagens 80-90 foram utilizadas nesse experimento.

4.4 O tratamento crônico com SIM aumenta a fluidez da membrana plasmática das células INS-1E

Considerando que as membranas biológicas dependem de maneira importante do conteúdo de colesterol para sua organização estrutural e funcional, os resultados anteriores sugerem que a diminuição significativa do conteúdo celular de colesterol pode ter tido um efeito importante no nível da membrana. Para tanto foram estudadas propriedades físicas da membrana plasmática utilizando espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons, EPR. Utilizando o 5-DSA como *probe* foi determinada a fluidez e rigidez da membrana plasmática na região próxima aos grupos polares, local onde o colesterol se insere na membrana modificando a organização desta. Sendo o colesterol uma das principais moléculas que permitem tal organização, a observação dos perfis de EPR após os tratamentos utilizados manifestam que aqueles em que acontece uma redução significativa do conteúdo de colesterol celular, apresentam picos amplos, maiores que no controle, indicando maior fluidez da membrana plasmática (**Figura 10A**).

Com o intuito de observar se o tipo de estatina gerava um efeito diferencial nas membranas, foi utilizada pravastatina, PRAV, durante 24 h e, em 3 experimentos observou-se que esta estatina hidrofílica aumenta a fluidez de membrana, todavia, em um menor grau, comparado com o mesmo tratamento de 24 h com SIM (**Figura 10B**). Os possíveis fundamentos por trás deste efeito serão discutidos na seção de discussão.

Ao analisar o tempo de correlação rotacional (τ_{corr}) foi observado que este é significativamente menor após o tratamento com SIM 24 h e M β CD 1 h, o que significa que, como consequência da diminuição do conteúdo de colesterol da membrana, os graus de liberdade para a movimentação dos fosfolípidios são maiores, de maneira que o tempo investido para rotar é menor, o que sinaliza uma maior fluidez da membrana junto com diminuição das regiões rígidas desta (**Figura 10C**). Esses resultados sugerem que os tratamentos redutores do colesterol celular não somente afetam aspectos funcionais da célula beta, como a sua capacidade secretora, mas também têm um efeito no nível estrutural que, certamente, se correlaciona com o efeito funcional observado.

Figura 10 – O tratamento crônico com SIM modifica as características físicas de membrana, aumentando a sua fluidez

(A) Espectro de EPR utilizando 5-DSA para observar mudanças no perfil, dependente de mudanças na rigidez e fluidez da membrana plasmática de células INS-1E ($n = 6$). (B) Espectro de EPR onde se comparam os perfis de tratamentos que diminuem o conteúdo de colesterol celular ($n = 3$). Linha preta, controle; linha vermelha, SIM 24 h; linha azul, PRAV 24 h; linha verde, M β CD 1 h. (mT, campo magnético em mili Tesla). (C) Tempo de correlação rotacional (τ_{corr}) do 5-DSA. O tratamento crônico com SIM reduz o τ_{corr} , estabelecendo que o tratamento aumenta a fluidez da membrana plasmática ($n = 8$). * $p < 0,05$ ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

4.5 O tratamento crônico com SIM desorganiza a membrana plasmática, alterando a distribuição de proteínas como o canal para cálcio do tipo L (Ca_v1.2) e syntaxina 1A (Syn1a), entre outras, em frações de membrana de células INS-1E

Uma vez que a redução do conteúdo de colesterol teve um efeito negativo sob o ponto de vista funcional, refletido na inibição da GSIS, junto com alterações nas características físicas da membrana, podendo afetá-la funcionalmente, foram feitos experimentos para determinar se esses tratamentos afetariam a distribuição proteica em domínios de membrana. Para tanto foram isolados microdomínios de membrana após tratamentos com SIM agudo e crônico, e M β CD 1 h como controle positivo. Esses microdomínios, devido à estratégia de isolamento utilizada baseada no tratamento das membranas isoladas com detergentes como Triton X-100, têm sido denominados como membranas resistentes a detergentes, ou DRM. Após o tratamento crônico com SIM e M β CD, observou-se uma redistribuição na membrana de proteínas como Ca_v1.2 e Syn1A, ambas componentes da maquinaria exocitótica, diminuindo, aparentemente, a localização em frações de membranas correspondentes a *lipid rafts* (**Figura 11A**). Outras proteínas estudadas como CPE e flotilina, ambas localizadas em *lipid rafts*, apresentam uma redistribuição nas membranas. De maneira interessante, estas mudanças se encontram associadas com uma diminuição no conteúdo de colesterol presente nos *lipid rafts* (**Figura 11B**). Esses resultados se correlacionam com os dados obtidos através de EPR. Os tratamentos que diminuem o conteúdo de colesterol celular e de membrana afetam negativamente propriedades físicas de membrana, aumentando a sua fluidez, o que, aparentemente, se reflete na desorganização na localização de proteínas da maquinaria de exocitose em domínios da membrana plasmática.

Figura 11 – O tratamento crônico com SIM leva a uma redistribuição na membrana de proteínas como $Ca_v1.2$ e Syn1A junto com a diminuição do conteúdo de colesterol em microdomínios de membrana

(A)

(B)

(A) *Western blots* de proteínas de frações de membrana de células INS-1E. Barra preta, frações 3-5 correspondentes a *lipid rafts*; H.T, homogenado total de membranas; C, controle; S 2 h, SIM 2 h; S24h, SIM 24 h; M 1 h, MβCD 1 h. (B) Análise do conteúdo de colesterol de DRMs ou *lipid rafts* (n = 6). *p<0,05, ANOVA de uma via pós teste *Tukey*. A banda 11 do controle em (A) não se mostra por erro experimental.

4.6 A suplementação com colesterol em células previamente tratadas com ZGA durante 24h restitui parcialmente a GSIS com um aumento do conteúdo celular de colesterol

Uma vez que os tratamentos que diminuem o conteúdo de colesterol celular e de membrana levam à inibição da GSIS junto com a perda de propriedades físicas da membrana e da organização de proteínas da maquinaria exocitótica em microdomínios, foi feita a restituição do colesterol em células submetidas a tais tratamentos. A incubação de células INS-1E durante 4 h com colesterol solúvel no meio de cultura após terem sido tratadas durante 24 h com ZGA recuperou o conteúdo celular de colesterol (**Figura 12A**). A utilização de ZGA antes do tratamento com colesterol solúvel permite a observação exclusivamente da contribuição do colesterol na GSIS, sem ter o interferente da redução dos grupos isoprenila, que seria observada juntamente com a queda de colesterol se fosse utilizada SIM 24 h. Ao analisar o efeito na GSIS, o tratamento com colesterol permitiu a restituição parcial da secreção de insulina (**Figura 12B**). Esses resultados permitem estabelecer, *a priori*, que a reincorporação do colesterol nas células INS-1E submetidas durante 24 h de inibição da sua síntese permite, aparentemente, a recuperação parcial da GSIS. Apesar de que não foi observada significância estatística na recuperação da GSIS (ZGA 24 h+CHOL 4 h vs ZGA 24 h), este resultado merece uma análise maior, que será abordada na discussão, e diz respeito ao tempo necessário para a reorganização da maquinaria de secreção após a restituição do colesterol celular e de membrana.

Figura 12 – A restituição do colesterol após o tratamento crônico (24 h) com ZGA restabelece o colesterol celular e, parcialmente, a GSIS em células INS-1E.

(A) Conteúdo total de colesterol após ZGA 24 h e reconstituição do colesterol após tratamento de ZGA 24 h (n = 5); *ZGA 24 h versus Controle; §ZGA 24h/CHOL 4 h versus ZGA 24 h; $p < 0,05$, ANOVA de uma via pós teste *Tukey*. (B) ZGA 24 h inibe GSIS que é parcialmente recuperada após tratamento com CHOL durante 4h (n = 6); * $p < 0,05$ (glicose 16,7 mM ZGA 24 h versus Controle).

4.7 O tratamento crônico de ilhotas pancreáticas de camundongo com ZGA diminui a secreção de insulina estimulada pela glicose

Com o intuito de avaliar se o resultado obtido após a inibição crônica da síntese de colesterol não correspondia a um efeito específico nas células INS-1E, ilhotas pancreáticas de camundongo foram isoladas e tratadas durante 24 e 48 h com ZGA. Dessa maneira, novamente, qualquer efeito funcional observado seria consequência exclusiva da diminuição do colesterol celular sem interferência da redução dos grupos isoprenila. O tratamento de 24 h trouxe uma diminuição significativa da GSIS nas ilhotas pancreáticas (**Figura 13A**). No entanto, contrariamente ao esperado, o tratamento de 48 h gerou uma diminuição não significativa na GSIS. Esses resultados confirmam, por uma parte, as consequências funcionais na célula beta de uma diminuição crônica do conteúdo celular de colesterol e, por outra, que, aparentemente, existiria algum tipo de mecanismo compensatório que impediria uma diminuição drástica do colesterol celular, o que se reflete numa diminuição não significativa da GSIS.

Figura 13 – O tratamento crônico de ilhotas pancreáticas de camundongo com ZGA diminui a GSIS em 24 h

(A) Secreção de insulina (corrigida pelo conteúdo total de insulina) em ilhotas de camundongo tratadas cronicamente com ZGA 20 μ M durante 24 e 48 h (n = 5) (ANOVA de duas vias). * $p < 0,05$.

4.8 O tratamento crônico de ilhotas de rato com SIM diminui a corrente de cálcio. O tratamento agudo e crônico com SIM diminui os eventos de fusão de grânulo à membrana, medidos por análise de capacitância

Apesar de que até aqui têm sido descritas evidências funcionais e estruturais relevantes que dão luzes sobre as bases estruturais por trás dos efeitos funcionais negativos obtidos a partir da redução significativa de colesterol nas células beta, foram feitos ensaios eletrofisiológicos que vêm contribuir com ambas as discussões.

Para tanto, ilhotas pancreáticas de rato foram isoladas, dispersadas e suas células tratadas com SIM por 2 h e 24 h, para posteriormente serem estudadas correntes de cálcio e eventos de fusão de grânulo através de análise de capacitância induzida por trens de despolarização. Ao analisar os dados de corrente é possível observar que somente no tratamento crônico com SIM há uma aparente diminuição da corrente de entrada para cálcio, no entanto, não significativa estatisticamente (**Figura 14A**). Esse resultado se encontra em concordância com os dados anteriores, em que, por uma desorganização de membrana consequente da redução do colesterol de membrana, é possível que a atividade do canal para cálcio se veja afetada. Os possíveis motivos serão discutidos na seção 5.2.2. Ao fazer uma análise de capacitância em resposta a trens de despolarizações, é possível observar que ambos tratamentos, agudo e crônico, com SIM diminuem o incremento na capacitância, isto é, diminuem os eventos de fusão de grânulo à membrana (**Figura 14B**). Esse resultado reafirma os dados funcionais da **Figura 3A** e **7A**. Particularmente, o achado de que o tratamento crônico tem um efeito maior de diminuição da capacitância, sugere que o proposto anteriormente em relação à alteração funcional da membrana decorrente da redução do conteúdo de colesterol desta, terá evidentemente uma consequência funcional, neste caso, uma diminuição de eventos de fusão de grânulos à membrana.

Figura 14 – O tratamento crônico de células de ilhotas de rato com SIM diminui as correntes de entrada de Ca^{2+} ; tanto o tratamento agudo como o crônico com SIM diminuem os eventos de fusão à membrana

(A)

(B)

(A) Correntes de entrada de Ca^{2+} medidas em ilhotas de rato tratadas por 2 h e 24 h com SIM ($n = 3$, 9 registros). (B) Medidas de capacitância de membrana em resposta a despolarizações em ilhotas de rato tratadas durante 2 h e 24 h com SIM ($n = 3$, 9 registros). Linha preta, controle; linha cinza, SIM 2 h; linha vermelha, SIM 24 h.

4.9 O tratamento de ratos com sinvastatina por via oral em tempos diferentes gera efeitos distintos sobre a secreção de insulina estimulada pela glicose de ilhotas pancreáticas isoladas

Considerando os efeitos observados pela sinvastatina na secreção de insulina em condições *in vitro*, foram feitos estudos *in vivo* com o intuito de observar o efeito que teria a estatina na secreção de insulina em condições fisiológicas. Para tanto, ratos *Wistar* adultos foram tratados com sinvastatina por via oral (gavagem) com uma dose de 5 mg/kg/dia durante dois períodos de tempo: 7 e 15 dias. De maneira interessante, os tratamentos tiveram efeitos diferentes. Ilhotas pancreáticas de rato isoladas de animais tratados durante 7 dias mostraram um aumento da sua secreção de insulina em resposta ao estímulo de alta glicose (**Figura 15A**). No entanto, o tratamento durante 15 dias não gerou nenhum efeito significativo na capacidade de secreção das ilhotas pancreáticas (**Figura 15B**), mas uma tendência à queda na secreção em resposta à glicose. Esses resultados sugerem a possibilidade de mecanismos de ação diferentes da estatina, seja ao nível da própria célula beta, ou ao nível periférico, induzindo um efeito que leva, no caso do tratamento de 7 dias, ao aumento da secreção de insulina. Os aspectos mecanísticos por trás de cada uma destas respostas não foram estudados no presente trabalho, mas serão analisados posteriormente.

Figura 15 – O tratamento de ratos com SIM durante 7 dias aumenta a GSIS, que desaparece com o tratamento durante 15 dias.

(A)

(B)

(A) Secreção de insulina (relativa ao conteúdo total de insulina) de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos tratados durante 7 dias com SIM 5 mg/Kg/dia ($n = 8$). ** $p < 0,01$. (B) Secreção de insulina de ilhotas pancreáticas de ratos tratados durante 15 dias com SIM 5 mg/Kg/dia ($n = 6$). Barras brancas, glicose 2,8 mM, barras cinza, glicose 5,6 mM, barras pretas, glicose 16,7 mM. *ANOVA de duas vias, pós teste de *Bonferroni*.

5 DISCUSSÃO

5.1 A inibição aguda da biossíntese de colesterol diminui a secreção de insulina como consequência da redução dos grupos isoprenila em células INS-1E

É sabido que o colesterol é o esteroide presente nas membranas biológicas de mamíferos, onde executa importantes funções de organização estrutural, a qual terá, evidentemente, um impacto direto em aspectos funcionais. A estratégia farmacológica da utilização de estatinas para reduzir o conteúdo de colesterol nas células beta e, dessa maneira, observar os efeitos no nível da membrana e como estes impactariam a GSIS abriu novas perguntas inicialmente não consideradas. A constatação de que o tratamento agudo com SIM inibia a secreção de insulina, sem diminuir o conteúdo de colesterol, suscitou a existência de um mecanismo independente de colesterol. As estatinas, ao inibirem a segunda reação enzimática da rota de biossíntese de colesterol, reduz a formação de intermediários de biossíntese e, conseqüentemente, do colesterol. Tais intermediários, particularmente os de natureza isoprenoide, têm se mostrado ser biologicamente ativos^{19, 57}. A secreção de insulina estimulada pela glicose é um evento que não se encontra alheio ao papel regulador dos intermediários isoprenoides, os quais são incorporados em proteínas reguladoras da secreção de insulina, na forma de modificações pós-traducionais. Dessa maneira, e com o achado na **Figura 1A**, foi necessário entender a contribuição que o farnesil pirofosfato e o geranilgeranil pirofosfato têm para a GSIS antes de estudar os efeitos do colesterol propriamente dito nos aspectos estruturais e funcionais da membrana plasmática.

5.1.1 A secreção de insulina estimulada pela glicose depende da síntese de intermediários isoprenoides

A rota metabólica de biossíntese de colesterol chama a atenção por ser uma via que requer a intervenção de várias reações enzimáticas e de custo energético considerável (já que requer ATP e equivalentes de redução). Intuitivamente, se espera que o seu produto final, o colesterol, tenha funções de importância fundamental para a célula que justifiquem o investimento energético elevado. De maneira interessante, ao observar a **Figura 1**, e como tem sido estabelecido no presente trabalho e na literatura, os intermediários de biossíntese possuem

numerosas funções biológicas. O intuito original do presente trabalho correspondia ao estudo da contribuição, nos fenômenos de membrana, que o colesterol tem para a secreção de insulina. Todavia, os experimentos iniciais através dos quais observamos a inibição da secreção de insulina estimulada pela glicose sem alteração do conteúdo celular de colesterol (**Figura 3**), trouxeram consigo dois questionamentos: a taxa de renovação do conteúdo celular de colesterol (*turnover* de colesterol) e a participação de intermediários de biossíntese na GSIS. Considerando que o tratamento de 2 h com SIM não gerou um aumento da fluidez de membrana (**Figura 10**), nem alterações no padrão de marcação de *lipid rafts* (**Figura 9**), nem mudanças significativas na organização de proteínas de membrana dependentes de colesterol para a sua localização em microdomínios (**Figura 11**), se deduz que 2 h de inibição da rota de biossíntese de colesterol não é tempo suficiente para diminuí-lo no nível da membrana (**Figura 11C**). É preciso estabelecer que 2 h de tratamento com SIM inibe a síntese de colesterol. Todavia, em condições *in vitro*, esse período de tempo não é suficiente para realizar a troca de colesterol com o meio de cultura, razão pela qual este se mantém aparentemente constante sem alterar as propriedades físicas de membrana. Em estudos desenvolvidos em cultura de célula primárias de espermatozoides e linhagem de macrófagos, observou-se que o efluxo de colesterol não ultrapassa 5% e 3%, respectivamente⁵⁸,⁵⁹. Esses dados da literatura, junto com as evidências propostas neste trabalho, permitiram propor que o efeito inibitório observado com 2 h de inibição da síntese de colesterol com SIM deve-se à redução na síntese de intermediários de natureza isoprenoide.

Apesar da consistência dos dados propostos em relação ao envolvimento da isoprenilação de proteínas por trás do efeito inibitório sobre a GSIS promovidos por SIM 2 h, existe a possibilidade de que a sinvastatina tenha tido um efeito inibitório em outros pontos das vias de controle da secreção de insulina. Certamente cabe tal pergunta, considerando os numerosos efeitos que as estatinas têm além da inibição da HMG-CoA redutase. Questionamentos referentes à inibição direta que a sinvastatina teria sobre outras proteínas que participam da secreção de insulina têm sido levantados. Tal é o caso de efeitos diretos na membrana plasmática e o da inibição do canal para cálcio do tipo L⁶⁰. Nesse sentido, apesar dos numerosos efeitos benéficos das estatinas, estas têm sido reportadas por estarem envolvidas em numerosos efeitos adversos. Existe controvérsia sobre o efeito que teriam no

nível da membrana, seja por interação direta com proteínas de membranas, como canais, ou por uma interação direta com fosfolipídios de membrana. Evidências eletrofisiológicas previamente publicadas na literatura sugerem que o tratamento com sinvastatina diminui a corrente de cálcio dependente de canais para cálcio do tipo L⁶⁰, por um efeito inibitório direto e reversível sobre o próprio canal. Todavia, drogas como a pravastatina, que possui propriedades químicas opostas à sinvastatina (pravastatina é hidrossolúvel, enquanto sinvastatina é lipossolúvel), não tiveram efeito inibitório sobre as correntes de cálcio nas células beta. No mesmo estudo, a utilização de uma forma mais solúvel de sinvastatina, que os autores chamam de sinvastatina-ácida, têm efeitos inibitórios sobre as oscilações de cálcio e sobre a própria secreção em resposta à glicose, todavia menores que os observados com sinvastatina. Apesar de não termos evidências no presente projeto que nos permitam propor ou rebater um eventual efeito inibitório direto da sinvastatina sobre a atividade do canal, o trabalho citado⁶⁰ deixa em evidência, através da utilização de estatinas com propriedades químicas diferentes, a possibilidade de que a própria interação de uma estatina lipossolúvel com a membrana poderia afetar fenômenos que nela acontecem. É possível que a sinvastatina, ao ser lipossolúvel, possa interagir com lipídios de membrana, particularmente nas imediações de proteínas chave para a secreção, como o canal para cálcio do tipo L. É sabido que o ambiente lipídico em torno do domínio trans-membrana de uma proteína é característico e determina ordenamentos moleculares da própria proteína⁶¹. Se a sinvastatina atravessa a membrana plasmática baseada nas suas propriedades de solubilidade, existe a possibilidade que se distribua na membrana de maneira que possa interferir no microambiente lipídico em torno do canal para cálcio, afetando a sua atividade e, conseqüentemente, alterando o influxo de cálcio e a fusão de grânulo à membrana. Essa possibilidade adquire relevância já que se acredita que uma das razões por trás dos efeitos adversos das estatinas, mais evidentes nas estatinas lipossolúveis que nas hidrossolúveis, seja justamente devido a uma interação direta com a membrana e a interferência em fenômenos biológicos que nela acontecem. Isso será analisado na seção **5.2.1.3**.

5.1.2 O tratamento agudo com SIM inibe a GSIS sem alterar o conteúdo total de insulina

Uma vez que o conteúdo de colesterol não teve variações significativas, a inibição da GSIS observada na **Figura 3** poderia ter tido como causa algum efeito da sinvastatina no nível da expressão de insulina. Ao analisar o conteúdo de insulina nas células INS-1E após o tratamento com SIM durante 2 h não foi observada nenhuma diferença no que diz respeito ao conteúdo de insulina celular. Esse dado, apesar de poder ser observado *a priori* como um experimento controle, é de relevância fundamental. Dentre os numerosos efeitos das estatinas, modificações ao nível da expressão gênica também podem ser esperadas. Todavia, a manutenção do conteúdo total de insulina após o tratamento agudo permite propor que a expressão do hormônio se manteve inalterada. Por sua vez, e tal como discutido acima, se consideramos que não houve alterações significativas na estrutura de membranas, nem mudanças na expressão do hormônio, o efeito negativo sobre a GSIS como consequência do tratamento agudo de sinvastatina deve se dever a alterações em fenômenos biológicos que acontecem entre a expressão do hormônio e a ancoragem/secreção do grânulo. Para afirmar que a diminuição da quantidade de grupos isoprenila decorrente do tratamento com sinvastatina gera efeitos no tráfico de grânulos de secreção, são necessários estudos mais avançados que incluem a superexpressão de proteínas que controlam o tráfico, como Rac1, com mutações que impeçam a incorporação de grupos isoprenila, estudos de *tracking* de grânulos de insulina marcados com proteínas fluorescentes, entre outros.

De acordo com o alvo farmacológico da sinvastatina na rota de biossíntese de colesterol (**Figura 1**) pode se intuir que a síntese de grupos isoprenila é afetada após a utilização de estatinas. Evidentemente, a determinação da concentração de farnesil pirofosfato e geranilgeranil pirofosfato na célula beta após o tratamento por 2 h com SIM seria a estratégia *gold standard* para poder afirmar com certeza e de maneira mais direta a responsabilidade que cabe a estes grupos químicos na diminuição da GSIS observada na **Figura 3**. Existe uma estratégia de quantificação desses grupos através de enzimas farnesil e geranilgeranil transferases que podem ser utilizadas para transferir os grupos FPP e GGPP de amostras biológicas para substratos químicos que, associados a FPP e GGPP, mudam seu estado de fluorescência, podendo ser quantificados por HPLC⁶². Todavia, é possível analisar,

pelo menos teoricamente, a respeito da disponibilidade de grupos isoprenila após a inibição da sua síntese, com base na atividade das enzimas envolvidas no processo de síntese de colesterol.

5.1.3 Os intermediários de biossíntese de colesterol são críticos para a GSIS

Ao analisar a rota de biossíntese de colesterol, pode-se observar que o farnesil pirofosfato corresponde a um intermediário crítico da rota metabólica. Isso porque constitui substrato para a farnesilação de proteínas, é substrato para a síntese de geranylgeranyl pirofosfato e é substrato para a síntese de esqualeno através da reação catalisada pela esqualeno sintase e, a partir deste, para a formação do colesterol. Uma vez que é ultrapassada a reação catalisada pela HMG-CoA redutase, as reações subsequentes se deslocam rapidamente para a formação de FPP e, a partir deste, de GGPP ou de colesterol. Para clarificar essa situação, basta olhar a estequiometria das reações de síntese associadas à rota metabólica de formação do colesterol, onde de quatro moléculas de FPP, uma é utilizada para a farnesilação de proteínas, uma é utilizada para sintetizar GGPP (por condensação de FPP, C15, com isopentenil pirofosfato, C5, resultando num composto C20) e duas para a síntese de colesterol. Isso é, 50% do FPP seriam utilizado exclusivamente para sintetizar colesterol. Neste sentido, se considerarmos que a esqualeno sintase (47 kDa) possui uma V_{max} de 4.800 nmol/min/mg e assumimos que existam 50 cópias da enzima por célula^{63, 64}, e que a concentração média de FPP celular é de 50 ng/mL, isto é, $6,04 \times 10^{-11}$ nmol/célula⁶², o FPP seria consumido em aproximadamente 3,2 min para exclusivamente sintetizar colesterol. Dessa maneira pode se inferir que após a inibição da HMG-CoA redutase os intermediários da biossíntese de colesterol, particularmente o FPP, seriam rapidamente utilizados, desprovendo a célula destes. Consequentemente deve-se desconsiderar a possibilidade da existência de “estoques” de moléculas isoprenoides como FPP e GGPP que possam ser utilizadas após a inibição da HMG-CoA redutase para assim garantir a sua presença para o controle de fenômenos celulares. Dessa maneira, e considerando que as reações de biossíntese de colesterol são irreversíveis, não seria possível sintetizar intermediários isoprenoides a partir, por exemplo, de colesterol.

Ao analisar a consequência funcional na célula beta do tratamento por 2 h com sinvastatina à luz do raciocínio anterior, a inibição da GSIS sem mudanças no conteúdo celular de colesterol e sem uma diminuição significativa no conteúdo total de insulina, as evidências apontam para o fato de que tal inibição da GSIS é consequência da inibição da formação de intermediários de biossíntese que possuem atividade biológica. Essas hipóteses adquirem valor uma vez que após a utilização de ácido zaragózico durante 2 h não se observou inibição da GSIS nas células INS-1E, sem mudanças no conteúdo celular de insulina (**Figura 5**), isto como consequência de que o ZGA inibe a síntese de colesterol, preservando os grupos isoprenila. Em consequência, tanto desde um ponto de vista teórico quanto experimental, é possível estabelecer que a inibição da GSIS observada pela ação aguda da sinvastatina é consequência da inibição da síntese de intermediários de síntese do colesterol.

5.1.4 O geranilgeranil pirofosfato contribui para a GSIS em células INS-1E

Dos mecanismos que controlam o processo de secreção de insulina, tem sido proposta a isoprenilação como um fator que contribui positivamente, dentre os quais se conta o favorecimento da migração do grânulo até a membrana plasmática e fusão com esta⁶⁵. Os grupos isoprenila, como mencionados na introdução, fazem parte de um grupo de moléculas de natureza hidrofóbica que executam a sua função biológica através da sua incorporação na estrutura de proteínas como parte de um tipo de modificação pós-traducional. A família das GTPases pequenas tem se mostrado ser modificada pós-traducionalmente através da incorporação de uma ou mais moléculas isoprenila. No caso particular das Rho GTPases, apresentam uma única sequência CAAX para serem isopreniladas (seja incorporação de FPP ou de GGPP). Todavia, proteínas pertencentes à família das Rab GTPases apresentam múltiplos domínios de isoprenilação, não necessariamente sendo estes de tipo CAAX²⁹. No caso particular das Rho GTPases, como Rac1 e Cdc42, tem-se mostrado que estão altamente envolvidas com o processo de secreção de insulina^{31, 32}. Consequentemente, a ausência de grupos isoprenila na célula beta terá consequências funcionais importantes.

Na seção anterior chegamos à conclusão, desde um ponto de vista teórico e através de evidências experimentais inibindo diferentes pontos da rota de

biossíntese de colesterol (através de SIM e ZGA), que a inibição da formação de grupos isoprenila impacta diretamente a GSIS. Todavia, na sequência consenso CAAX de isoprenilação pode ser incorporado tanto FPP quanto GGPP, o que dependerá do tipo de isoprenil-transferase (farnesil transferase ou geranilgeranil transferase). O grupo GGPP possui uma hidrofobicidade maior do que o grupo FPP e inclusive do que o palmitoil²⁸, o que proporciona uma força de interação maior com membranas biológicas.

Embora não se tenha clareza em quanto ao mecanismo por trás da preferência por um tipo ou outro de modificação pós-traducional que incorpore grupos hidrofóbicos, as Rho GTPases são modificadas preferencialmente através da isoprenilação. No caso particular de Rac1, tem se mostrado que, aparentemente, a incorporação do geranilgeranil é crítica para a sua localização em estruturas celulares, como grânulo e membrana plasmática^{31, 66}. Para tanto, no presente projeto foi utilizada a estratégia de inibir tanto a geranilgeranil transferase do tipo I quanto desafiar células INS-1E com SIM após carregá-las com GGPP. A inibição da GSIS observada após o tratamento com GGTi alcançou níveis observados com o tratamento agudo com SIM, o que permite propor que a geranilgeranilação de proteínas é crítica para a GSIS acontecer. Esse fato foi confirmado através da incorporação de GGPP em células INS-1E e desafiar agudamente com SIM, observando a prevenção do efeito inibitório da GSIS que a SIM gera (**Figura 3, 6**).

Apesar de que no presente projeto não foi avaliada a geranilgeranilação de Rac1, fato que tecnicamente não é trivial, se considerarmos o discutido acima, de que a inibição da GSIS após 2 h com SIM pode se dever a alterações no tráfico de grânulo, a inibição da geranilgeranilação de Rac1, envolvida com tráfico de grânulo de insulina na célula beta, é um mecanismo plausível de ter sido afetado. Consequentemente, a presença dos grupos isoprenila, particularmente do GGPP, tem um efeito positivo sobre a GSIS. No entanto, essa afirmação deve ser feita com cuidado.

Foi proposto, em uma publicação em 2010¹⁹, que o tratamento durante 24 h com GGPP aumentaria a GSIS em células MIN6, linhagem de célula beta pancreática. Esse dado, contraditório com o apresentado na **Figura 6**, onde o tratamento com GGPP durante 24 h não gera nenhum efeito estimulante da GSIS, é suscetível de críticas. Propor que o tratamento com GGPP terá em si mesmo um efeito que potencia a GSIS é contraditório à luz das reações que constituem a

biossíntese de moléculas isoprenoides e do colesterol, as que são de tipo irreversíveis. Em consequência, pensar na possibilidade de que, ao administrar GGPP, conseguir-se-á utilizá-lo como substrato para sintetizar colesterol ou outros intermediários não responde ao papel estimulador da GSIS que o GGPP teria no citado trabalho. Ao mesmo tempo, os autores apresentam um dado em que, ao coadministrar tanto GGPP quanto um inibidor da geranylgeranyl transferase, observa-se um aumento na GSIS comparado com o controle. Considerando que ao estar inibida a geranylgeranyl transferase não é possível que o GGPP coadministrado possa ser transferido como modificação pós-traducional a proteínas envolvidas na secreção de insulina, cabe a possibilidade de que o GGPP possa ter algum efeito biológico, além do já descrito como grupo hidrofóbico incorporado em estrutura de proteínas.

Finalmente, apesar de que os dados apresentados aqui propõem e reafirmam propostas feitas na literatura sobre o papel que os grupos isoprenila desenvolvem na GSIS, ainda existem perguntas a serem respondidas sobre o papel dos grupos isoprenila no fenômeno secretório. Dentre estas se contam: o GGPP e FPP têm algum efeito na secreção de insulina independente da isoprenilação de proteínas? O GGPP contribuiria como âncora lipídica do grânulo de insulina em regiões específicas da membrana plasmática (*lipid rafts*)? Da mesma maneira como existem enzimas geranylgeranyl transferases, existem enzimas que façam o contrário, de maneira que uma proteína isoprenilada possa ser “desprenilada” e reutilizada? Essas e outras interrogações deveriam ser abordadas em projeto subsequente com o intuito de contribuir com a elucidação dos efeitos dos intermediários da síntese do colesterol na fisiologia da célula beta pancreática.

5.2 A inibição crônica da rota de biossíntese de colesterol diminui a secreção de insulina estimulada pela glicose como consequência da alteração estrutural e funcional da membrana de células INS-1E

O papel que o colesterol desenvolve no aspecto organizacional da membrana plasmática tem sido amplamente estudado. De maneira interessante, os sistemas biológicos evoluíram em direção à utilização do colesterol como elemento central da organização estrutural das membranas, decorrendo desta organização a especialização de funções. Sem necessidade de possuir grandes conhecimentos quanto aos aspectos moleculares por trás da organização estrutural que o colesterol

confere às membranas, o fato de observar que a quantidade deste esterol é alta permite intuir, por sua vez, a alta dependência que a organização estrutural-funcional da membrana tem por ele.

O fenômeno da secreção, por ser um evento que acontece na membrana plasmática, não se encontra alheio aos aspectos estruturais de membrana dependentes do colesterol. Como foi apresentado na introdução desta tese assim como na literatura, a célula beta constitui um interessante modelo de estudo da participação do colesterol no fenômeno secretório, desde que o colesterol interviria tanto no tráfego quanto na fusão do grânulo. Uma vez que o intuito original do trabalho era estudar o efeito do colesterol *per se* na secreção, foram feitos experimentos de secreção após tratamentos crônicos de SIM e ZGA, que efetivamente diminuíssem o conteúdo celular de colesterol. Uma vez achado o efeito inibitório sobre a GSIS que a diminuição significativa de colesterol celular teve, foi estudado o aspecto físico por trás da diminuição do conteúdo de colesterol na membrana, através de imunofluorescência de membrana, EPR e estudos de isolamento de *lipid rafts*. A recuperação da função secretória após a restituição de colesterol foi chave na elucidação do papel funcional do colesterol. Todavia, existem diversos aspectos teóricos e experimentais em torno dos resultados obtidos que serão discutidos nas seções seguintes.

5.2.1 O conteúdo de colesterol celular é determinante para o processo de secreção de insulina acontecer apropriadamente

O papel do colesterol no controle do fenômeno da secreção tem sido estudado em diferentes sistemas. Particularmente o envolvimento do colesterol na secreção de insulina tem sido estudado desde um ponto de vista funcional com algumas aproximações estruturais. Nesse sentido há dois trabalhos fundamentais.

No primeiro deles, através da utilização de inibidor específico da esqualeno epoxidase, observou-se uma diminuição na secreção de insulina com uma diminuição na localização do canal para cálcio $Ca_v1.2$ em *lipid rafts*⁶⁷. No segundo trabalho, através de técnicas de eletrofisiologia, observou-se que a diminuição do conteúdo de colesterol celular reduz os eventos de fusão de grânulo (através de medidas de capacitância), os quais são recuperados, parcialmente, após a restituição do colesterol celular⁴⁴.

No presente projeto, a inibição da síntese de colesterol através da utilização crônica de sinvastatina e ácido zaragózico trouxe um efeito negativo sob o ponto de vista funcional, através da diminuição da secreção de insulina estimulada pela glicose (**Figura 7A e 8A**) com uma diminuição significativa do conteúdo celular de colesterol. Nesse sentido, e em concordância com a discussão referente à função que os grupos isoprenila desempenham no controle da GSIS, surge uma questão fundamental: por que a utilização crônica de SIM não traz uma inibição da GSIS maior que a observada, como consequência dos efeitos da diminuição do conteúdo de colesterol celular e da inibição da síntese de grupos isoprenila?

A resposta para essa pergunta surge a partir do efeito observado com o tratamento crônico com ZGA. Uma vez que a inibição da esqualeno sintase permite a inibição da síntese de colesterol sem afetar a síntese dos grupos isoprenila (**Figura 1**), a diminuição da GSIS observada na **Figura 7A** se deveria exclusivamente à diminuição do conteúdo celular de colesterol. De maneira interessante, a inibição da GSIS observada após o tratamento crônico com SIM é semelhante à observada com o tratamento crônico com ZGA. Todavia, estes resultados respondem parcialmente o questionamento anterior. Se pensarmos agora em termos de função de membrana derivada do conteúdo de colesterol, é possível intuir que uma diminuição significativa deste afetará os fenômenos que nela acontecem, dentre eles a secreção.

Dessa maneira, é possível explicar a situação anterior sob dois pontos de vista: da isoprenilação e do colesterol. No primeiro caso, havendo uma alteração na migração de grânulos por conta de uma diminuição da isoprenilação, a GSIS ver-se-á afetada, sem importar se a membrana apresenta suas funções relacionadas com a secreção alteradas por conta da diminuição do seu conteúdo de colesterol. No segundo caso, mesmo considerando que a migração de grânulos não apresente alterações devido à presença dos grupos isoprenila (o que acontece com o tratamento com ZGA), uma vez que os grânulos atinjam a membrana plasmática, o fenômeno secretório não acontecerá apropriadamente. Em consequência, na **Figura 7A** não se observa uma inibição maior na GSIS porque, mesmo desconsiderando o fato de que a migração de grânulo encontrar-se-á afetada pela diminuição na isoprenilação de proteínas, se houvesse grânulos que atingissem a membrana plasmática, pela alteração funcional desta decorrente da diminuída concentração de colesterol, a secreção não acontecerá.

5.2.1.1 Efeitos da perda de colesterol em outras estruturas celulares

Apesar de a membrana plasmática ser o local onde a fusão de grânulo acontece para a liberação do hormônio, existem outras organelas e estruturas cuja membrana precisa de um apropriado conteúdo de colesterol para assistir outros processos associados à secreção: a destinação de pró-insulina ao grânulo e a integridade deste. O processo de destinação ou, do seu termo em inglês, *sorting*, tem se mostrado ser dependente de *lipid rafts* presentes na membrana da rede trans *Golgi*. Em estudos desenvolvidos em células AtT-20 no começo dos anos 2000 determinou-se que a CPE, necessária para o processo de *sorting* de neuropeptídeos, requer a interação com *lipid rafts* presentes na membrana da rede trans *Golgi*^{68, 69}.

De maneira interessante, e tal como explicitado na introdução, muitas proteínas que fazem parte da maquinaria proteica do grânulo de secreção correspondem a proteínas “receptoras” que assistem o processo de destinação de hormônios ao grânulo. Consequentemente, uma diminuição na síntese de colesterol celular geraria efeitos negativos a partir de eventos iniciais da secreção. É possível intuir que a diminuição do conteúdo celular de colesterol observado na **Figura 7B** e **8B** tenha consequências no nível da membrana plasmática e também na rede trans *Golgi*. Consequentemente, a formação de novos grânulos de secreção se veria afetada.

Isso sugere uma problemática adicional. Após 24 h de tratamento tanto com SIM quanto com ZGA não foram observadas mudanças significativas no conteúdo total de insulina após a secreção estimulada pela glicose. Esse fato, à luz das eventuais alterações na destinação de pró-insulina aos grânulos de secreção na rede trans *Golgi* sugere um paradoxo. Se consideramos que, pela diminuição do conteúdo total de colesterol acontece uma diminuição da destinação de pró-insulina desde a rede trans *Golgi* para os grânulos de secreção, deveria se observar uma diminuição na quantidade de grânulos secretórios e, consequentemente, no conteúdo total de insulina (seja pela retenção do hormônio na rede trans *Golgi*, seja pela cessação da sua síntese). No entanto, o fato de não se observar mudanças no conteúdo total de insulina pode ser explicado a partir da discussão anterior: considerando que a membrana plasmática apresentaria mudanças estruturais que determinam uma alteração na secreção (será discutido mais adiante), os grânulos contidos no citosol no começo do experimento de tratamento crônico com SIM e

ZGA não teriam sido secretados. Em consequência, o conteúdo total de insulina, que não mudou, proviria destes grânulos retidos, não sendo possível observar mudanças na síntese de novos grânulos decorrente de alterações na rede trans *Golgi*.

Certamente a estrutura fundamental do processo secretório de hormônios e neuropeptídeos é o próprio grânulo. No caso particular da célula beta, o grânulo de insulina possui um alto conteúdo de colesterol, o que faz supor, *a priori*, um papel funcional. A membrana do grânulo tem a sua origem na membrana da rede trans *Golgi*, onde existem *lipid rafts* cuja estrutura tem função de suporte físico para proteínas do *sorting*, que também constituirão parte do proteoma do grânulo. Todavia, o alto conteúdo de colesterol, da ordem de 45 mol%, não é o simples reflexo da transferência “por defeito” do colesterol da rede trans *Golgi* para o grânulo. É possível que o colesterol permita, entre outras funções, conferir resistência mecânica à membrana que facilite a armazenagem de altas concentrações de hormônio.

No entanto, o aumento do conteúdo de colesterol do grânulo de insulina, através da administração de colesterol exógeno, diminui a capacidade secretória em resposta a estímulo. Em estudos feitos utilizando colesterol fluorescente, observou-se dois fatos interessantes: o colesterol administrado é estocado pela célula beta nos grânulos de secreção de insulina (e não nas vesículas pequenas semelhantes a vesículas sinápticas, SLSV, do inglês *synaptic like small vesicles*) e o aumento do colesterol de grânulo aumenta a retenção de clatrina⁷⁰. Uma vez que a clatrina é liberada dos grânulos durante o processo de amadurecimento deste, acredita-se que tal retenção impeça o apropriado amadurecimento do grânulo.

O alto conteúdo de colesterol no grânulo abre a possibilidade da formação de *lipid rafts* na sua membrana. Daqui surgem dois aspectos interessantes. O primeiro deles diz respeito à dinâmica por trás da formação de *lipid rafts*. O segundo é sobre qual a utilidade de se formar microdomínios de membrana no grânulo. Pouco se sabe a respeito do controle por trás da formação de *lipid rafts*. De qualquer maneira, isso será discutido mais adiante. A possibilidade da formação de microdomínios de membrana no grânulo constitui uma hipótese não abordada neste trabalho, mas que será estudada futuramente.

Brevemente, a formação de *lipid rafts* supõe uma organização estrutural que permitirá a localização nestas regiões de proteínas que provavelmente possuem maior afinidade por regiões estruturadas de membrana (seja por domínios de interação com colesterol ou fosfolipídios característicos de *lipid rafts* como esfingomielina). O enriquecimento em colesterol que a membrana do grânulo possui possibilitaria a formação de microdomínios favorecendo a localização e estruturação neles de complexos proteicos com funções celulares relevantes. Tal seria o caso da pré-organização das proteínas vSNAREs, organizando-se dessa maneira os elementos do grânulo da maquinaria de secreção, antes da ancoragem do grânulo à membrana. Não existem evidências disponíveis que suportem essa ideia em modelos celulares. Todavia, em estudos desenvolvidos em vesículas artificiais unilamelares gigantes, GUVs, tem-se proposto que aconteceria o contrário: regiões ricas em colesterol excluiriam a localização nelas de proteínas do complexo vSNARE como VAMP⁷¹. Se tal organização for replicada em modelos celulares, isso implicaria em que as vSNAREs requereriam uma organização mais estocástica no grânulo do que em complexos rígidos. Mesmo assim, ainda existindo controvérsias a respeito, a presença de alto conteúdo de colesterol no grânulo não é um evento trivial, mas que determinaria implicações funcionais importantes.

Em consequência, a presença do colesterol em diversas estruturas celulares teria um papel funcional determinante para cada etapa do processo secretório, desde a gênese do grânulo, a composição deste, entre outros eventos. Todavia a presença de colesterol na membrana plasmática parece ser determinante para a sua organização estrutural, da qual decorrem aspectos funcionais como a secreção.

5.2.1.2 Efeito paradoxal do conteúdo de colesterol de membrana

No presente projeto, e em outras evidências da literatura, tem sido proposto que a diminuição do conteúdo celular de colesterol inibe a secreção de insulina estimulada pela glicose^{44, 67}. De maneira interessante, existem trabalhos que têm estudado a aproximação contrária: quais os efeitos funcionais na célula beta que o aumento do conteúdo celular de colesterol teria. Através da utilização de modelos de célula beta *knock-out* para transportadores de colesterol, tem se mostrado que o acúmulo de colesterol celular diminui a secreção de insulina estimulada pela glicose, conseguindo se reverter o efeito negativo sobre a GSIS através da utilização de

M β CD ou de estatinas^{45, 46}. Isto sugere, evidentemente, que existe uma janela de concentrações de colesterol nas quais são preservadas as funções celulares que garantem uma apropriada secreção. Como foi discutido no item anterior, não somente a membrana plasmática é suscetível a alterações funcionais decorrentes da diminuição (ou aumento) do conteúdo de colesterol. No entanto, se pensarmos somente em termos da membrana plasmática, as alterações do conteúdo de colesterol gerarão alterações de caráter físico, que impactarão diretamente em aspectos funcionais.

Os dados apresentados na **Figura 10** são claros em sinalizar que os tratamentos que diminuem significativamente o conteúdo celular de colesterol aumentam a fluidez da membrana plasmática. Mesmo não tendo sido desenvolvidos experimentos de suplementação de células INS-1E com colesterol para então analisar por EPR a fluidez e rigidez das suas membranas, através do raciocínio análogo ao utilizado neste trabalho, um aumento da concentração de colesterol nas membranas deveria aumentar a rigidez e diminuir a fluidez da membrana. Portanto, a manutenção da concentração do colesterol celular, e de membrana, dentro de uma determinada margem permitiria a manutenção das propriedades físicas das quais decorrem os aspectos funcionais de membrana.

É interessante destacar que as mudanças de concentração de colesterol das quais decorreram as alterações funcionais observadas na **Figura 7** e **8** são consideráveis. Nos modelos de acúmulo de colesterol em células beta, a quantidade de colesterol celular aumenta consideravelmente inibindo também a GSIS. Isso significa que a janela de concentrações de colesterol na qual são mantidas as propriedades físicas e funcionais de membranas é ampla, permitindo dois raciocínios. Por uma parte, é possível que a célula beta, e provavelmente outros tipos celulares, possuam mecanismos especializados, como processos de reciclagem de membranas, via endocítica e exocítica, que permitam manter concentrações de colesterol sempre dentro desta faixa, cujo valor ainda não foi determinado. Por outra parte, é possível pensar que os modelos eucarióticos, cujas membranas dependem de esteróis para a sua organização, tenham evoluído no sentido de manter amplas concentrações de esterol de membrana, de maneira que, para observar efeitos funcionais negativos, por depleção de colesterol por exemplo, seja preciso diminuições drásticas (aproximadamente de 50% como observado na **Figura 7B**). Dessa maneira, altas concentrações de colesterol (no caso de

mamíferos) podem ser um mecanismo de garantir a manutenção das propriedades físicas de membranas.

5.2.1.3 *Efeito das estatinas nas membranas biológicas: efeito diferencial segundo a natureza química da estatina?*

Apesar de que não existem evidências claras a esse respeito, acredita-se que certos efeitos adversos das estatinas seriam devidos à natureza química das estatinas, tal como explicitado mais acima. O possível envolvimento de estatinas hidrofóbicas com eventos locais no nível da membrana plasmática tem sido discutido. Nesse sentido, no presente trabalho é apresentado um dado experimental que, apesar de não ter sido aprofundado por não ser este o seu intuito, representa uma informação interessante de ser discutida.

Como se mostra na **Figura 10B**, a utilização de pravastatina, estatina de natureza hidrofílica, nas mesmas condições de concentração e tempo de tratamento que sinvastatina (24 h 1 μ M), gerou um efeito diferente do que o observado no caso do tratamento crônico da sinvastatina. De maneira interessante, o tratamento com pravastatina não gerou um aumento na fluidez da membrana das células INS-1E nos níveis observados após o tratamento com sinvastatina. Todavia, aumentou a fluidez da membrana com respeito ao controle. Apesar de não possuir um dado experimental funcional que possa confirmar os efeitos da pravastatina sobre a GSIS, o dado de EPR permite aventar algumas conjeturas dos efeitos da estatina hidrossolúvel na célula INS-1E.

Pensando exclusivamente no efeito físico na membrana plasmática, o aumento da fluidez de membrana gerada pela pravastatina, desde um ponto de vista qualitativo, se encontra entre a situação controle e o tratamento com sinvastatina que efetivamente gera um aumento significativo da fluidez, observável como a mudança no perfil de EPR. Se assumirmos que tanto a sinvastatina quanto a pravastatina têm a mesma afinidade pela HMG-CoA redutase, inibindo-a na mesma medida, a maior fluidez de membrana após 24 h com SIM em relação ao mesmo tratamento com pravastatina, permite inferir a possibilidade de que a SIM possa ter gerado um efeito local na membrana, fluidificando-a e contribuindo com o efeito “fluidificante” da SIM pela diminuição do conteúdo de colesterol de membrana. Contudo, são necessários mais estudos que possam esclarecer o papel diferencial

de estatinas lipo e hidrossolúveis na membrana, particularmente sua interação com proteínas integrais, como canais, transportadores e receptores.

5.2.2 As propriedades físicas de membrana determinam sua organização funcional

Uma vasta quantidade de estudos tem sido desenvolvida com o intuito de esclarecer aspectos estruturais de membrana, tanto desde a óptica da sua composição lipídica quanto proteica. Ao compreender que as membranas biológicas possuem uma organização característica da qual derivam as funções especializadas que desenvolve, é possível inferir que a sua estruturação segue um padrão característico. Apesar de que as membranas apresentam características fluidas, a organização de um padrão arranjado deve possuir uma temporalidade que possivelmente controlaria a estruturação de microdomínios funcionais de membrana, ricos em colesterol, de maneira a “pre-organizar” a membrana, antecedendo ou antecipando um fenômeno de sinalização, secreção, entre outros. Particularmente, a célula beta, pela sua especialização de função secretória, requer a manutenção de características físicas de membrana que garantam a apropriada organização da maquinaria de secreção em verdadeiras plataformas funcionais, os *lipid rafts*.

5.2.2.1 A redução do colesterol de membrana leva à alteração de propriedades físicas da membrana, levando-a à “randomização” estrutural: alteração da organização do complexo SNARE

A importância do colesterol como organizador das membranas biológicas é de conhecimento geral e tem sido estudada há décadas. Todavia, as particularidades desse controle e as consequências funcionais variam entre tipos celulares. O colesterol, tal como mencionado na introdução deste trabalho, permite diminuir os graus de liberdade da movimentação das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios de membrana, sem afetar, significativamente, a movimentação lateral destes. Como consequência, contribui com o ordenamento da membrana e outorga parâmetros de fluidez e rigidez característicos.

A técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons, cuja origem remonta aos anos 1940, vem sendo utilizada nas ciências biomédicas. Particularmente no campo de estudos de membranas tem permitido estudar

aspectos físicos de membrana, a partir dos quais é possível derivar valiosas informações. Para tanto, no presente projeto foi utilizado o EPR com o intuito de observar mudanças na fluidez e rigidez da membrana plasmática das células INS-1E submetidas a tratamentos com SIM.

A diminuição do conteúdo de colesterol celular, e também das membranas, trouxe um aumento na fluidez, observado na mudança do perfil de EPR na **Figura 10A** e no aumento no tempo de rotação do 5-DSA (**Figura 10C**). Evidentemente, uma diminuição do conteúdo de um composto que confere rigidez à membrana trará consigo um aumento da fluidez. Em termos físicos constitui um resultado intuitivo e esperado. No entanto, tal evento possui implicações funcionais interessantes.

No presente projeto, também foram desenvolvidos estudos de estrutura de membrana analisando a localização de proteínas do complexo SNARE em microdomínios ricos em colesterol. Apesar de não serem evidentes diminuições significativas de proteínas como Ca_v1.2 em *lipid rafts* (ou DRMs), há uma aparente re-distribuição de proteínas em diversas frações de membrana, o que sinaliza uma desorganização da membrana ou, como tem sido cunhado neste trabalho, uma randomização da membrana.

Voltando à análise dos dados de EPR, cabe destacar que, mesmo na situação em que não se tenha os dados de *western blot* de proteínas SNARE de frações de membrana, expostos na **Figura 11**, só o fato de se observar um aumento na fluidez da membrana permite hipotetizar as consequências que este evento traria. A mais importante delas é o fato de que uma membrana mais fluida apresentará uma diminuída organização de proteínas que requerem um ambiente altamente estruturado para poderem interagir com outras proteínas, constituindo complexos que organizam eventos celulares como a secreção de insulina. Esses resultados, por sua vez, colocam a técnica de EPR como uma ferramenta de grande utilidade para o estudo de membranas biológicas. Nesse sentido, e com o intuito de resolver o paradoxo funcional que o conteúdo de colesterol possui nas membranas biológicas, discutido na seção **5.2.1.2**, a medida das características físicas da membrana como fluidez e rigidez após a incorporação de colesterol nas células permitiria esclarecer se a diminuição da GSIS em células com alto conteúdo de colesterol é consequência de um aumento da rigidez da membrana.

Com o intuito de confirmar que a diminuição do conteúdo de colesterol levou à randomização da membrana, foram estudadas por *western blot* proteínas do complexo tSNARE como Syn1A e o próprio canal para cálcio Ca_v1.2 que, mesmo não sendo uma SNARE, constitui peça fundamental da maquinaria de secreção. Quando são analisadas proteínas localizadas em *lipid rafts* através da estratégia de isolamento de membranas resistentes a detergentes, se espera que os tratamentos que diminuem o conteúdo de colesterol celular e de membrana, diminuam a quantidade de proteína nessas regiões, aumentando a concentração em frações de membrana “não-*lipid raft*”. É evidente na **Figura 11A** que proteínas como o Ca_v1.2 se encontram nas DRMs na situação controle e, mesmo com uma diminuição significativa do conteúdo de colesterol das DRMs, não se observa uma diminuição significativa do canal nas frações equivalentes aos *lipid rafts*. No entanto, ao observar a situação do canal para cálcio na membrana após o tratamento com M β CD, é evidente uma redistribuição da proteína na membrana, diminuindo a localização em regiões de membrana específica, o que faz sentido com o termo de randomização de membrana utilizado nesse trabalho. Cabe destacar que a diminuição do conteúdo de colesterol celular afetou também a localização de proteínas como CPE em frações de membrana DRM, correspondentes a *lipid rafts*. Lembrando o discutido mais acima, CPE participa na destinação de pró-insulina ao grânulo de secreção em plataformas lipídicas ou *lipid rafts* no nível da membrana da rede trans-*Golgi*. Apesar de não termos as análises necessárias para determinar a localização específica de CPE na rede trans-*Golgi* (através de imunofluorescência), baseando-nos nesse resultado e em evidências na literatura, possivelmente a diminuição da GSIS após 24 h de tratamento com SIM possa ser atribuída, em parte, a uma alteração no *sorting* ou destinação de pró-insulina no grânulo secretório. Em trabalhos anteriores^{44, 58, 67} tem sido proposta a localização em DRMs de proteínas SNARE e outras proteínas acessórias da maquinaria de secreção (como o canal para potássio sensível a ATP), como consequência da diminuição do conteúdo de colesterol celular. No entanto, correlacionar essa informação com alterações em propriedades físicas de membrana através de estudos de EPR, expostos no presente trabalho, representam uma novidade desde um ponto de vista experimental e conceitual.

Apesar da utilidade prestada pela técnica de EPR nesse trabalho, ao mesmo tempo abrem-se novas interrogações a serem respondidas. A mais intrigante delas

diz respeito à modulação temporal que o colesterol teria na organização dessas plataformas funcionais chamadas de *lipid rafts*. Existe também a possibilidade de que as membranas biológicas possuam uma “janela” de concentração de colesterol que permita uma fluidez apropriada para organizar *lipid rafts* e, ao mesmo tempo, que conduza apropriadamente os eventos funcionais decorrentes da estrutura de membrana. Essa última questão é tecnicamente factível de ser desenvolvida, sendo um objetivo pessoal para projetos futuros. No entanto, a questão dos aspectos temporais por trás da organização de *lipid rafts* constitui uma linha de pensamento sumamente interessante, todavia complexa de resolver desde o ponto de vista técnico. Essa questão será abordada na seção **5.2.2.1.1**.

5.2.2.1.1 DRMs: lipid rafts ou artefato experimental?

A estratégia utilizada de isolar regiões de membrana resistentes a detergentes tem sido amplamente utilizada com o intuito de estudar membranas correspondentes a *lipid rafts*. No entanto, essa estratégia tem sido alvo de discussão a respeito do seu verdadeiro valor informativo sobre estrutura e composição de microdomínios de membrana. A estratégia bioquímica que tradicionalmente tem sido utilizada para o isolamento de *lipid rafts* corresponde à utilizada no presente projeto: isolamento de membranas resistentes ao tratamento com detergentes não iônicos como o Triton X-100. Nela são isolados, através de gradientes de sacarose, frações de membrana que, pela sua composição com uma alta razão lipídios:proteínas, possuem uma densidade menor que outras frações de membrana do tipo “não *lipid raft*”, podendo ser facilmente isoladas. No entanto, existem evidências que apontam que a própria utilização de detergentes levaria à formação de agregados de lipídios-proteínas não existentes na membrana, em outras palavras, criando um artefato técnico⁷². Tem sido proposto um procedimento experimental que dispensa a utilização de detergentes e de ultracentrifugações de longa duração (mais de 16 h) permitindo a obtenção de *lipid rafts* purificados⁷³. De qualquer maneira, embora haja a possibilidade de obtenção de resultados falsos positivos, a estratégia de isolamento de microdomínios de membrana através da ultracentrifugação de frações de membrana solubilizadas com detergente continua sendo utilizada. Nesse sentido, a maior fonte de críticas a respeito do estudo de microdomínios de membrana é a ausência de estudos que mostrem o seu comportamento dinâmico em amostras não

fixadas. Daqui surgem dois problemas fundamentais ainda sem solução: observação de *lipid rafts* e, associado a isto, a dinâmica temporal de formação e desorganização destes.

A visualização de *lipid rafts* tem sido motivo de estudo. A ferramenta fundamental corresponde à utilização da toxina B de cólera que se liga com o gangliosídeo GM1, que se encontra em maior proporção nos *lipid rafts*. Todavia, para obter imagens satisfatórias é necessário estabelecer um *crosslink* de subunidades de toxina ligadas aos gangliosídeos através de anticorpos, gerando agregados ou *clusters* de *lipid rafts*. Essa foi a estratégia utilizada no presente projeto (**Figura 9**). Uma vez que os *clusters* de *lipid rafts* observados correspondem a agrupamentos de dimensões microscópicas de microdomínios de membrana pré-existent, acredita-se que o que se observa nestes *clusters* corresponderia aos *lipid rafts* na sua estrutura nanoscópica. Portanto, ao observar uma diminuição no padrão de marcação após o tratamento com SIM 24 h e M β CD, pode-se intuir que os próprios *lipid rafts* deveriam ter a sua estrutura também alterada por conta da diminuição do conteúdo de colesterol. Essa mesma estratégia de visualização dos *lipid rafts* tem sido utilizada para o desenvolvimento de novas técnicas ópticas avançadas que permitam a resolução suficiente para observá-los. Tal é o caso da já citada microscopia NSOM⁴⁷. Essa estratégia permite a visualização em escala nanoscópica de células intactas, com uma resolução superior aos 80 nm. Através dessa ferramenta tem sido proposto pelo grupo de pesquisa que a desenvolveu⁴⁷ que existiria uma unidade elementar nanoscópica de *rafts* composta de colesterol, proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI-AP) e proteínas transmembranas, que existiria em repouso, sendo a base para um *lipid raft* funcional durante um evento celular. De maneira interessante, essa estratégia, apoiada em modelos matemáticos (simulações de Monte Carlo), tenta elucidar a dinâmica com que esses nanodomínios se formariam. Em consequência, a disponibilidade de ferramentas técnicas de imagem poderia favorecer a discussão em torno da organização espaço-temporal dos *lipid rafts*.

No entanto, mesmo dispondo de estratégias dessa natureza, apoiados em modelos matemáticos, existem outras questões associadas à dinâmica da organização dos *lipid rafts*. No caso particular da célula beta, modelo secretório utilizado neste trabalho, é possível que os grânulos que compõem a primeira fase de secreção já se encontrem pré-organizados na membrana plasmática em plataformas

do tipo *lipid rafts*. Todavia, para a manutenção da secreção, isto é, a segunda fase, seria necessária a organização de novos *lipid rafts* com os elementos da maquinaria de secreção (tSNAREs, Ca_v1.2, Cav1, etc). Quais os sinais que levariam à organização de novas plataformas ricas em colesterol são desconhecidos. No entanto, deve existir um mecanismo de conversa entre o tecido alvo (a célula beta nesse caso) e o sinal que ativará esse tecido para que organize funcionalmente a sua membrana em microdomínios, melhor dito, nanodomínios, ricos em colesterol.

Para exemplificar melhor a hipótese anterior, vamos supor o caso de uma célula que possui receptores para um hormônio qualquer. Se o receptor dessa célula estiver organizado em *lipid rafts*, isolado ou associado a co-receptores ou outras proteínas, este precisa se organizar nestas plataformas funcionais antes do hormônio chegar para poder se ligar a este. Para tanto existem duas possibilidades: ou o receptor se encontra organizado em *lipid rafts* todo o tempo ou existe um padrão oscilatório de organização e desorganização de *lipid rafts* dentro de uma faixa de tempo. A primeira possibilidade apresenta diversas dificuldades, dentre elas estruturais de membrana, custo energético (manutenção da maquinaria de síntese de colesterol para garantir a concentração desse na membrana plasmática tempo todo), entre outras. No entanto, a segunda possibilidade parece ser mais plausível pelos motivos seguintes. Se pensarmos que existe um padrão oscilatório na célula, através do qual se determina a formação e desorganização de *lipid rafts* com o receptor em questão, a coordenação deste padrão oscilatório com a frequência com que o hormônio é secretado garantiria a organização dos *rafts* no tempo apropriado para acontecer a ligação entre o receptor e o hormônio. Entender os mecanismos por trás desse possível fenômeno poderia responder muitos dos questionamentos existentes sobre a dinâmica dos *lipid rafts*, contribuindo com o melhor entendimento sobre a organização temporal que determine funções da membrana plasmática.

5.2.2.2 A randomização de membrana leva à alteração funcional de elementos-chaves do processo de secreção: função do canal para cálcio

Um caso particular de alteração funcional associada à randomização de membrana constitui a atividade do canal para cálcio. Os dados apresentados nesta tese apontam que o aumento da fluidez de membrana é decorrente da diminuição do conteúdo de colesterol, o que explicaria uma perda da localização específica do

canal $\text{Ca}_v1.2$ em *lipid rafts*. Os dados funcionais de eletrofisiologia apontariam que, após 24 h com SIM, haja uma diminuição das correntes de cálcio. Se tal efeito é independente da inibição direta da SIM sobre o canal, discutido previamente na literatura⁵⁸, então poderia ser dependente da organização do canal em plataformas funcionais de membrana como os *rafts*. Essa hipótese é reforçada por um trabalho na literatura feito com canal para cálcio $\text{Ca}_v1.2$. Nesse trabalho é proposto que a perda da associação entre o canal e proteínas residentes de *lipid rafts* traria consigo o afastamento do canal de subunidades regulatórias, como o sensor para cálcio, afetando a atividade do canal e inibindo a secreção de insulina estimulada por glicose e hormônios como GLP-1⁷². Portanto, é possível pensar que o desarranjo de *lipids rafts* consequente da diminuição do colesterol celular e de membrana não somente afetaria a simples localização da maquinaria secretória num mesmo espaço físico e funcional como os microdomínios de membrana, mas também afetaria a interação de subunidades de uma mesma proteína, afetando a sua atividade.

5.2.3 A recuperação do colesterol celular restabelece a capacidade de secreção de insulina

Como tem sido amplamente discutido, o colesterol *per se*, como molécula, executa um papel estrutural fundamental nas membranas biológicas, controlando diversos fenômenos, como a secreção de hormônios. Apesar de que as evidências aqui apresentadas são consistentes desde um ponto de vista estrutural (visto através de EPR e fracionamento de membranas) como fundamento do efeito funcional que a diminuição do conteúdo de colesterol gerou na célula beta (diminuição da GSIS, diminuição de eventos de fusão de grânulo e de correntes para cálcio), foi necessária mais uma estratégia para confirmar tal efeito: recuperação funcional através da reincorporação de colesterol.

Tal como sinaliza a **Figura 12**, a recuperação do colesterol celular que diminuiu como consequência do tratamento com ZGA trouxe uma recuperação, embora parcial, da GSIS. Esse dado merece uma análise mais rigorosa. Ao observar os dados aqui apresentados e da literatura^{45, 46}, é evidente que as células beta possuem uma quantidade de colesterol que contribui positivamente para a GSIS. Em modelos celulares em que a célula beta acumula colesterol, a retirada deste permite

a recuperação de função; a reincorporação de colesterol após a redução deste pelo uso de SIM também recupera a função secretória.

Intuitivamente, um pensamento cartesiano leva a deduzir que a contribuição do colesterol na GSIS, em termos estruturais de membrana, se reduz a uma questão estequiométrica. No entanto, ao olhar detidamente a **Figura 12B**, mesmo a GSIS não sendo de uma magnitude normalmente esperada (como a observada em resultados anteriores neste trabalho), o fato de ter sido observada uma recuperação parcial da GSIS após a incorporação de colesterol nas células tratadas com ZGA por 24 h propõe que a recuperação do colesterol, em termos de concentração, seria só uma parte da resolução do problema da recuperação funcional da secreção estimulada pela glicose. Neste sentido, provavelmente 4h de tratamento com colesterol foi tempo suficiente como para restabelecer o estoque celular e de membrana de colesterol. No entanto, é possível que não tenha sido tempo suficiente para que este se faça parte da totalidade dos elementos estruturais que o requerem para a organização funcional da membrana. Em outras palavras, se pudéssemos cunhar um novo conceito, é provável que as proteínas que requerem *lipid rafts* para sua organização estrutural e funcional tenham alguma propriedade “*raftofílica*”, isto é, possuam afinidade pelos microdomínios de membrana ricos em colesterol. Nesse sentido, é possível que, para que tal interação aconteça, se requeira um tempo superior ao tempo necessário para a simples incorporação do colesterol nas células.

Dessa maneira, se pudéssemos aplicar esse conceito para o resultado obtido, é provável que 4 h de tratamento de incorporação de colesterol não tenha sido suficiente para que todas as proteínas que requerem se associar a *lipid rafts* o tenham conseguido. Consequentemente, a membrana recupera parcialmente a sua organização estrutural, do qual decorreria uma recuperação parcial da sua função, neste caso, secretória.

Um resultado apresentado na literatura e discutido com anterioridade neste trabalho poderia reafirmar essa hipótese. *Vickman et al*⁴⁴ observaram que os eventos de capacitância induzidos por trens de despolarização diminuem ao retirar colesterol celular pela estratégia do uso de M β CD, demonstrando uma diminuição nos eventos de fusão de grânulos à membrana. De maneira interessante, no mesmo experimento, quando foi reincorporado o colesterol observou-se uma recuperação da capacitância. Todavia, tal recuperação foi, embora estatisticamente significativa, parcial, isto é, não recuperou os eventos de fusão de grânulo à membrana ao

mesmo nível que o observado no controle. Portanto, é provável que exista uma organização de estruturas do tipo “pré-*lipid rafts*” nas quais haveria proteínas inseridas e que seriam a estrutura base para a formação de um *lipid raft* após estímulo; requerer-se-ia um tempo determinado para a organização de suficientes dessas unidades “pré-*lipid rafts*” para que posteriormente, após estímulo, constituam as plataformas funcionais que garantam, neste caso, uma secreção apropriada.

Se essa hipótese for correta, constituiria uma interessante aproximação teórica que explicaria o porquê a reconstituição do colesterol, embora recupere a GSIS, ainda não seja suficiente para recuperar integralmente a capacidade secretória. Mais experimentos de fracionamento de membrana e EPR seriam necessários, após a administração de colesterol, para avaliar se as características físicas da membrana são efetivamente recuperadas ao reincorporar colesterol.

5.3 O tratamento crônico com sinvastatina em modelo *in vivo* gera efeitos diversos

Com os resultados anteriormente expostos, a primeira impressão que se teria das estatinas seria de um possível efeito diabetogênico. Por conta disso, vários estudos e revisões na literatura têm proposto um possível papel das estatinas como promotoras dessa condição, seja por efeitos diretos na célula beta ou nos tecidos periféricos, através de novos efeitos pleiotrópicos ainda desconhecidos^{75, 76}.

Nesse sentido, o intuito original de tratar ratos com estatinas era observar possíveis mudanças na capacidade secretória das suas ilhotas. No entanto, dois efeitos, opostos, foram achados após os tratamentos utilizados.

Se considerarmos que o organismo tem uma alta capacidade de síntese e reaproveitamento do colesterol, seja através da própria via de biossíntese de colesterol, via entero-hepática, absorção da dieta, etc, pensar na possibilidade de que o tratamento com estatinas possa chegar a reduzir o conteúdo de colesterol de membranas de maneira importante como a observada *in vitro* neste estudo, parece ser pouco provável. Cabe ressaltar que esses resultados requerem estudos mecanísticos mais profundos, todavia são inseridos no presente trabalho pela relevância do achado no contexto dos efeitos das estatinas sobre a síntese de colesterol e de seus intermediários de biossíntese.

Nesse sentido, o tratamento de 7 dias com SIM aparece como um resultado paradoxal à luz dos efeitos mostrados nos tratamentos *in vitro* neste e em outros estudos. Mesmo sem ter resultados mais apurados que possam explicar o fenômeno, e considerando a variedade de efeitos pleiotrópicos das estatinas, o aumento da secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas possivelmente se deva a uma resposta compensatória. O receptor de insulina localizar-se-ia em microdomínios de membrana ricos em colesterol⁷⁷. Consequentemente, possíveis variações no conteúdo de colesterol desses domínios em tecidos periféricos poderia ter afetado, negativamente, a sinalização do hormônio, induzindo um evento de resistência periférica à insulina. Em resposta a esse evento, as células beta dos animais tratados durante 7 dias com SIM podem, possivelmente, ter gerado uma resposta compensatória à resistência periférica, aumentando a sua secreção, ficando esta evidente nos ensaios de secreção estática em resposta à glicose (**Figura 15A**).

Por sua vez, o tratamento de 15 dias com SIM gerou um efeito diferente. Como foi estabelecido anteriormente, embora o resultado não seja significativo, apresenta uma tendência à diminuição da secreção de insulina que as ilhotas têm em resposta a glicose (**Figura 15B**). Novamente, ao não possuímos resultados experimentais como os desenvolvidos *in vitro* que permitam caracterizar se a diminuição da GSIS é consequência da redução do conteúdo celular de colesterol, não é possível propor uma resposta concreta. No entanto, de acordo com os dados apresentados anteriormente neste trabalho e com evidências da literatura que propoem os efeitos diabetogênicos das estatinas^{75, 76, 78}, é possível estabelecer, *a priori*, algumas hipóteses ao respeito. Se pudéssemos tratar o efeito observado após o tratamento de 15 dias com SIM à luz dos resultados obtidos no tratamento crônico com SIM no modelo *in vitro*, podemos estabelecer que, cronicamente, a SIM poderia ter tido algum efeito na função da célula beta. No entanto, a diminuição aparente da GSIS nas ilhotas pode ter sido consequência tanto do efeito da diminuição da isoprenilação de proteínas, quanto da diminuição do conteúdo de colesterol de membrana.

Se formos críticos e mantivéssemos a afirmação de que por conta dos mecanismos endógenos a possibilidade de uma diminuição de colesterol no nível das membranas (seja plasmática quanto de organelas chave como a rede trans-Golgi) não seria totalmente possível, caberia sinalizar que a aparente diminuição da

GSIS seria consequência da isoprenilação de proteínas. Pensar dessa maneira não seria totalmente errado, mais ainda considerando que o alvo das discussões em torno do papel diabetogênico das estatinas se focam mais no papel da isoprenilação de proteínas e no controle da GSIS do que nos aspectos estruturais e funcionais de membrana discutidos nesta tese.

Apesar das evidências apresentadas nesse trabalho junto com as propostas na literatura, cabe ressaltar que as estatinas, apesar dos seus numerosos efeitos pleiotrópicos, tem tido um papel fundamental na clínica. Dita importância se sustenta em numerosas evidências que estabelecem que efetivamente as estatinas induzem efeitos benéficos em diversos tecidos, particularmente permitindo cardioproteção⁷⁹, aumento do NO endotelial, regulando contratilidade vascular⁸⁰, entre outros numerosos estudos disponíveis na literatura.

Finalmente, os resultados expostos no presente trabalho, junto com evidências propostas na literatura, permitem estabelecer que a dependência que o fenômeno de secreção de insulina tem em relação à rota de biossíntese de colesterol é muito mais complexa do que uma dupla dependência (isoprenilação de proteínas e organização estrutural de membrana). Os diversos aspectos da fisiologia da célula beta envolvidos nessa dependência (**Figura 16**) abrem diversas perspectivas de estudo e novas perguntas a serem abordadas.

Figura 16 – Participação do colesterol e de intermediários de sua biossíntese na secreção de insulina.

Em círculos de linha pontilhada se mostram os diversos eventos em que o colesterol e seus intermediários se encontram envolvidos com a secreção de insulina.

6 CONCLUSÕES

As evidências obtidas no presente trabalho permitem estabelecer que a secreção de insulina estimulada pela glicose possui uma dependência em relação à rota de biossíntese de colesterol, a qual seria, aparentemente, bivalente: dependeria tanto da isoprenilação de proteínas quanto do conteúdo celular de colesterol. Consequentemente, é possível afirmar que a rota de biossíntese de colesterol contribui positivamente com a secreção de insulina, modulando-a através dos grupos isoprenila e facilitando, através do colesterol, a organização estrutural e funcional da membrana.

REFERÊNCIAS*

1. Rhodes CJ, Halban PA. Newly synthesized proinsulin/insulin and stored insulin are released from pancreatic B cells predominantly via a regulated, rather than a constitutive, pathway. *The Journal of Cell Biology*. 1987;105(1):145-53.
2. Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*. 1968;83(3):572-84.
3. Südhof T, Rothman J. Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 2009;323(5913):474-77.
4. Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Kikuta T, Kumakura K, Nakamichi Y, Nagamatsu S. Site of Docking and fusion insulin secretory granules in live MIN6 β cells analysed by TAT-conjugated anti syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(9):8403-08.
5. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research*. 2003;44(4):655-67.
6. Park JJ, Loh YP. How peptide hormone vesicles are transported to the secretion site for exocytosis. *Molecular Endocrinology*. 2008;22(12):2583-95.
7. Blanco EH, Zúñiga JP, Andrés ME, Alvarez AR, Gysling K. Corticotropin-releasing factor binding protein enters the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells and cortical neurons. *Neuropeptides*. 2011;45(4):273-9.
8. Rhodes JC, Lucas CA, Mutkoski RL, Orci L, Halban PA. Stimulation by ATP of proinsulin to insulin conversion in isolated rat pancreatic islet secretory granules. Association with the ATP-dependent proton pump. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(22):10712-7.
9. Hou JC, Min L, Pessin JE. Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis. *Vitamins and Hormones*. 2009;80:473-506.
10. Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*. 2001;106(4):499-509.
11. Suckale J, Solimena M. The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2010;21(10):599-609.
12. Varadi A, Ainscow EK, Allan VJ, Rutter GA. Involvement of conventional kinesin in glucose-stimulated secretory granule movements and exocytosis in clonal pancreatic beta-cells. *Journal of Cell Science*. 2002;115(Pt 21):4177-89.
13. Baltrusch S, Lenzen S. Monitoring of glucose regulated single insulin secretory granule movement by selective photoactivation. *Diabetologia*. 2008;51(6):989-96.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: \ <http://www.icmje.org>

14. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000;49(11):1751-60.
15. Chernomordik LV, Kozlov MM. Mechanics of membrane fusion. *Nature Structural & molecular biology*. 2008;15(7):675-83.
16. Nevis AK, Thurmond DC. A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(3):1944-52.
17. Finegold L. Chapter 1: The Biophysical and cell biology of cholesterol: an hypothesis for the essential role of cholesterol in mammalian cells. In: *Cholesterol in membrane models*. Florida: CRC Press Inc; 1993. p. 2-10.
18. Mc Taggart SJ. Isoprenylated proteins. *Cellular and molecular life sciences*. 2006;63(3):255-67.
19. Tsuchiya M, Hosaka M, Moriguchi T, Zhang S, Suda M, Yokota-Hashimoto H, Shinozuka K, Takeuchi T. Cholesterol biosynthesis pathway intermediates and inhibitors regulate glucose-stimulated insulin secretion and secretory granule formation in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2010;151(10):4705-16.
20. Metz SA, Rabaglia ME, Stock JB, Kowluru A. Modulation of insulin secretion from normal rat islets by inhibitors of the post-translational modifications of GTP-binding proteins. *Journal of Biochemistry*. 1993;295(Pt1):31-40.
21. Nevis AK, Thurmond DC. Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(28):18961-72.
22. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366(9493):1267-78.
23. Kishore SP, Herbstman BJ. Adding a medicine to the WHO model list of essential medicines. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2009;85(3):237-9.
24. Linetti A, Fratangeli A, Taverna E, Valnegri P, Francolini M, Cappello V, Matteoli M, Passafaro M, Rosa P. Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *Journal of Cell Science*. 2010;123(Pt4): 595-605.
25. Pechlivanis M, Kuhlmann J. Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids: More than just membrane anchoring. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. 1764(12): 1914-31.
26. Metz SA, Rabaglia ME, Pintar TJ. Selective inhibitors of GTP synthesis impede exocytotic insulin release from intact rat islets. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(18):12517-27.
27. Kowluru A. Small G proteins in islet beta-cell function. *Endocrine reviews*. 2010;31(1):52-78.

28. Black SD. Development of hydrophobicity parameters for prenylated proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;186(3):1437-42.
29. Leung KF, Baron R, Seabra MC. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Geranylgeranylation of Rab GTPases. *Journal of Lipid Research*. 2006;47(3):467-75.
30. Vecchione C, Gentile MT, Aretini A, Mariano G, Poulet R, Maffei A, Passarelli F, Landolfi A, Vasta A, Lembo G. A novel mechanism of action for statins against diabetes-induced oxidative stress. *Diabetologia*. 2007;50(4):874-80.
31. Li J, Lou R, Kowluru A, Li G. Novel regulation by Rac1 of glucose and forskolin-induced insulin secretion in INS-1 beta cells. *American Journal of Physiology, endocrinology and Metabolism*. 2004;286(5):E818-27.
32. Nevis, A. K., Thurmond, D. C. Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(28):18961-72.
33. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews.Molecular and Cell Biology*. 2008;9(2):112-24.
34. O'Connor JW, Klauda JB. Lipid membranes with a majority of cholesterol: applications to the ocular lens and aquaporin 0. *Journal of Physical chemistry B*. 2011;115:6455-64.
35. Guidotti G. Membrane Proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 1972;41:731-52.
36. Khelashvili G. Chapter 1: Background and motivation. In: *Theoretical and Simulation study of lipid membranes: application to lipid rafts*. VDM Verlag Dr. Müller Aktiengesellschaft & Co. 2009. p. 11-26.
37. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972;175(4023):720-31.
38. Engelman DM. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*. 2005;438(7068):578-80.
39. Pike LJ. The challenge of lipid rafts. *Jornal of Lipid Research*. 2008;Suppl:S323-8.
40. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schönle A, Hell SW. *Nature*. 2009;457(7233):1159-62.
41. Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*. 1998;8(6):723-32.
42. Stulnig TM, Berger M, Sigmund T, Raederstorff D, Stockinger H, Waldhäusl W. Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *The Journal of cell biology*. 1998;143(3):637-44.

43. Lang T, Bruns D, Winzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, Jahn R. SNAREs are concentrated in cholesterol dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO Journal*. 2001;20(9):2202-13.
44. Vikman J, Jimenez-Felström J, Nyman P, Thelin J, Eliasson L. Insulin secretion is highly sensitive to desorption of plasma membrane cholesterol. *The FASEB Journal*. 2009;23(1):58-67.
45. Kruit JK., Wijesekara N, Fox JE, Dai XQ, Brunham JR, Searle GJ, Morgan GP, Costin AJ, Tang R, Bhattacharjee A, Johnson JD, Light PE, Marsh BJ, Macdonald P E, Verchere CB, Hayden MR. Islet cholesterol accumulation due to loss of ABCA1 leads to impaired exocytosis of insulin granules. *Diabetes*. 2011;60(12):3186-96.
46. Souza JC, Vanzela EC, Ribeiro RA, Rezende LF, de Oliveira CA., Carneiro EM, Oliveira HC, Boschero AC. Cholesterol reduction ameliorates glucose-induced calcium handling and insulin secretion in islets from low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1831(4):769-75.
47. van Zanten TS, Gómez J, Manzo C, Cambi A, Buceta J, Reigada R, Garcia-Parajo MF. Direct mapping of nanoscale compositional connectivity on intact cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(35):15437-42
48. Brustolon M, Giamello E. Chapter 1: Introduction to electron paramagnetic resonance. Chapter 4: electron paramagnetic resonance spectroscopy in the liquid phase. In: *Electron Paramagnetic Resonance, A Practitioner's Toolkit*. 1st ed. New Jersey: Wiley; 2009. p. 3-35; 116-130.
49. Cantor CR, Schimmel PR. Chapter 25: Introduction to membrane equilibria and to bilayers. In: *Biophysical Chemistry Part III: The behavior of biological macromolecules*. 1st ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company; 1980, cap. 25.
50. Marczak A, Kowalczyk A, Wrzesien-Kus A, Robak T, Jozwiak Z. Interaction of doxorubicin and idarubicin with red blood cells from acute myeloid leukaemia patients. *Cell Biology International*. 2006;30(2):127-32.
51. Gordon LM, Looney FD, Curtain CC. Fatty-acid spin probe interactions with erythrocyte ghosts and liposomes prepared for erythrocytes ghosts. *The Journal of Membrane Biology*. 1989;111(2):155-68.
52. Coderch L, Fonollosa J, De Pera M, Estelrich J, De La Maza A, Parra JL. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2000;68(1):85-95.
53. Simon I. Differences in membrane unsaturated fatty acids and electron spin resonance in different types of myeloid leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1979;556(3):408-22.
54. Henry SA, Keith AD. Membrane properties of saturated fatty acid mutants of yeast revealed by spin labels. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1971;7(4):245-65.

55. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*. 2004;145(2):667-78.
56. Reverter M, Rentero C, de Muga SV, Alvarez-Guaita A, Mulay V, Cairns M, Wood P, Monastyrskaya K, Pol A, Tebar F, Blasi J, Grewal T, Enrich C. Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-SNARE trafficking, assembly, and function. *Molecular Biology of the Cell*. 2011;22(21):4108-23
57. Mc Taggart SJ. Isoprenylated proteins. *Cellular and Molecular life sciences*. 2006;63(3):255-67.
58. Takeo T, Hoshii T, Kondo Y, Toyodome H, Arima H, Yamamura K, Irie T, Nakagata N. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biology of Reproduction*. 2008;78(3):546-51.
59. Tam SP, Mok L, Chimini G, Vasa M, Deeley RG. ABCA1 mediates high-affinity uptake of 25-hydroxycholesterol by membrane vesicles and rapid efflux of oxysterol by intact cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*. 2006;291(3):C490-502.
60. Yada T, Nakata M, Shiraishi T, Kakei M. Inhibition by simvastatin, but not pravastatin, of glucose-induced cytosolic Ca^{2+} signaling and insulin secretion due to blockade of L-type Ca^{2+} channels in rat islet beta-cells. *British journal of pharmacology*. 1999;126(5):1205-13.
61. Lee AG. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003;1612(1):1-40.
62. Hoff GP, Volmer DA, Wood WG, Müller WE, Eckert GP. Isoprenoid quantification in human brain tissue: a validated HPLC-fluorescence detection method for endogenous farnesyl- (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008;392(4):673-80.
63. Soltis DA, McMahon G, Caplan SL, Dudas DA, Chamberlein HA, Vattay A, Dottavio D, Rucker ML, Engstrom RG, Cornell-Kennon SA, Boettcher BR. Expression, purification, and characterization of the human esquelene synthase: use of yeast and baculoviral systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995;316(2):713-23.
64. Sealey-Cardona M, Camerer S, Jones S, Ruiz-Pérez LM, Brun R, Gilbert IH, Urbina JA, González-Pacanowska D. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: Selective inhibitor by Quinuclidine derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(6):2123-9.
65. Kowluru A. Protein prenylation in glucose-induced insulin secretion from the pancreatic islet β cell: a perspective. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008;12(1):164-73.
66. Veluthakal R, Kaur H, Goalstone M, Kowluru A. Dominant-negative alpha-subunit of farnesyl- and geranylgeranyltransferase inhibits glucose-stimulated, but not KCl-stimulated, insulin secretion in INS 832/13 cells. *Diabetes*. 2007;56(1):204-10.

67. Xia F, Xie L, Mihic A, Gao X, Chen Y, Gaisano HY, Tsushima RG. Inhibition of cholesterol biosynthesis impairs insulin secretion and voltage-gated calcium channel function in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2008;149(10):5136-45.
68. Dhanvantari S, Loh YP. Lipid raft association of carboxipeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(38):29887-93.
69. Zhang CF, Dhanvantari S, Lou H, Loh YP. Sorting of carboxipeptidase E to the regulated secretory pathway requires interaction of its transmembrane domain with lipid rafts. *The Biochemical Journal*. 2003;369(Pt3):453-60.
70. Bogan JS, Xu Y, Hao M. Cholesterol accumulation increases insulin granule size and impairs membrane trafficking. *Traffic*. 2012;13(11):1466-80.
71. Bacia K, Schuette CG, Kahya N, Jahn R, Schwille P. SNAREs prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(36):37951-5.
72. Mayor S, Maxfield FR. Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Molecular biology of the cell*. 1995;6(7):929-44.
73. Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *Journal of lipid research*. 2005;46(5):1061-7.
74. Jacobo SM, Guerra ML, Jarrard RE, Przybyla JÁ, Liu G, Watts VJ, Hockerman GH. The intracellular II-III loops of Ca_v1.2 and Ca_v1.3 uncouple L-type voltage-gated Ca²⁺ channels from glucagon-like peptide-1 potentiation of insulin secretion in INS-1 cells via displacement from lipid rafts. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2009;330(1):283-93.
75. Sampson UK, Linton MF, Fazio S. Are statins diabetogenic? Current opinion in cardiology. 2011;26(4):342-7.
76. Yoon JS, Lee HW. Diabetogenic effects of statins: a double-edged sword? *Diabetes & Metabolism Journal*. 2013;37(6):415-22.
77. Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Stralfors P. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(13):9670-8.
78. Shah RV, Goldfine AB. Statins and risk of new-onset diabetes mellitus. *Circulation*. 2012;126(18):e282-4.
79. Herrington W, Emberson J, Staplin N, Blackwell L, Fellström B, Walker R, Levin A, Hooi LS, Massy ZA, Tesar V, Reith C, Haynes R, Baigent C, Landray MJ; SHARP Investigators. The effect of lowering LDL cholesterol on vascular access patency: post hoc analysis of the Study of Heart and Renal Protection. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;9(5):914-9.
80. Rossoni LV, Wareing M, Wenceslau CF, Al-Abri M, Cobb C, Austin C. Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-

activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric arteries. Clinica Science. 2011;121(10):449-58.