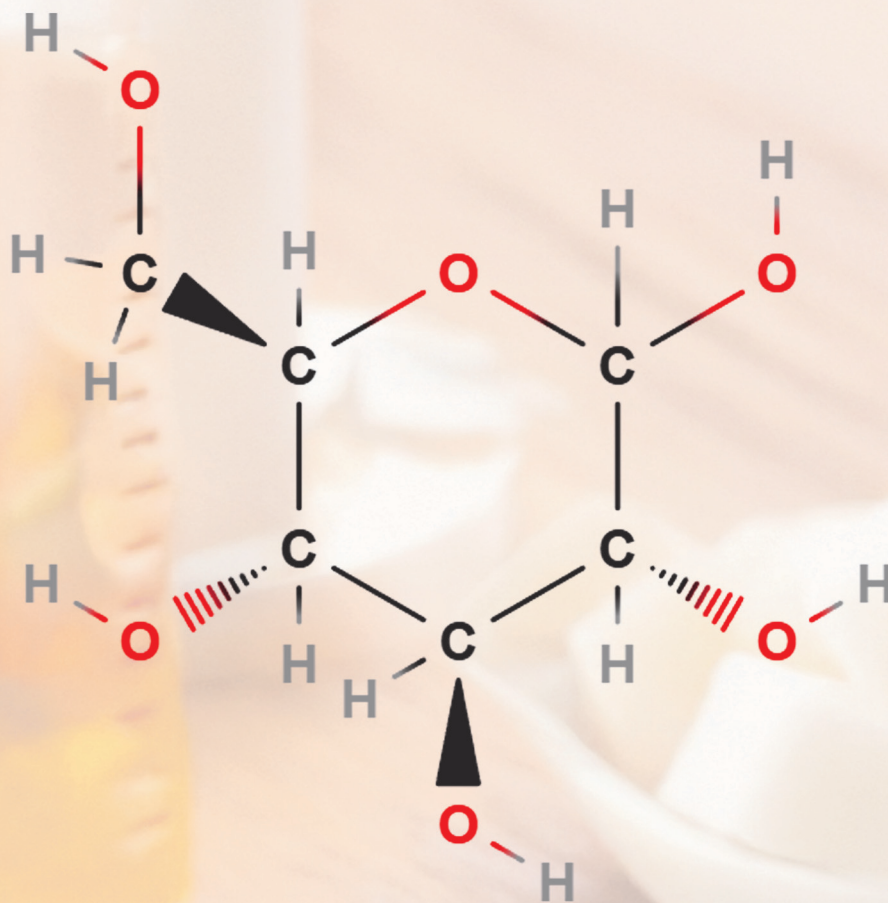


JOSÉ NICOLAU



FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS DE DIABETES



USP

FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS DE DIABETES

JOSÉ NICOLAU

Professor Sênior do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral-FOUSP

FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS DE DIABETES

Esta obra foi produzida no âmbito do Edital 2024 de Apoio à Publicação de Livros Digitais da USP da Agência de Bibliotecas e Coleções Digitais ABCD.



Catálogo da Publicação

N639f Nicolau, José
Fundamentos bioquímicos de diabetes / José Nicolau. -- São Paulo: FOU SP,
2025.
340p.

ISBN: 978-65-5787-052-5
DOI: 10.11606/9786557870525

1. Bioquímica - fundamentos. 2. Diabetes Mellitus. I. Nicolau, José. II. Título.

CDD 574.192

Ficha catalográfica elaborada por Fábio Jastwebski – CRB8/5280

DEDICATÓRIA

Dedico este livro a uma pessoa muito especial, minha esposa e companheira Marieta Lúcia, que partiu, mas estará sempre em nossos corações. Sua linda trajetória como educadora foi pautada pela luta por uma Educação Infantil de qualidade. Exemplo de esposa, mãe, avó e sogra, Marieta semeava o amor, a bondade, a compreensão e o respeito pelo ser humano. Com ela, descobri o significado da palavra “amor”. Agradeço a Deus por conceder-me o privilégio de ter a Marieta na minha vida.

Aos meus pais Maria e Jorge (in memorian), por tudo que fizeram, sem medir esforços nem sacrifícios para que eu pudesse estudar.

Aos meus filhos, José Cícero, Marilúcia e Mariângela, netos Marina, Juliana e Eduardo, nora Laura e genros Gilberto e Alberto pelo integral apoio que me tem cumulado, neste momento.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Alyne Simões, que gentilmente se prontificou a me ajudar no processo de inscrição deste livro para avaliação.

A todos meus professores, colegas, alunos e amigos com os quais sempre pude aprender algo.

A todos aqueles que longe ou perto, procuraram me confortar no período muito difícil de minha vida.

SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	11
APRESENTAÇÃO.....	12
CAPÍTULO 1 - CÉLULA: BASE DOS ORGANISMOS VIVOS.....	13
CÉLULA - UM SISTEMA AQUOSO.....	15
CÉLULAS DE MAMÍFEROS: ARQUITETURA CELULAR.....	15
MEMBRANA PLASMÁTICA.....	15
FUSÃO DE MEMBRANAS.....	18
NÚCLEO.....	19
MITOCONDRIA.....	20
LISOSSOMOS.....	22
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	23
APARELHO DE GOLGI.....	23
PEROXISSOMOS.....	24
BIBLIOGRAFIA.....	26
CAPÍTULO 2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES.....	32
INTRODUÇÃO.....	32
DIABETES: MODELOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	33
MODELOS ESPONTÂNEOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS TIPO 1.....	33
Camundongo NOD.....	34
Rato BB.....	35
Ratos LETL e KDP.....	36
Ratos LEW.1-AR-1-IDDM.....	36
Camundongo Akita.....	36
MODELOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS TIPO II.....	37
Rato Zucker Obeso.....	37
Rato Goto Kakizaki.....	37
Camundongo db/dB.....	38
MODELOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS INDUZIDOS QUIMICAMENTE.....	38
ALOXANA.....	39
ESTREPTOZOTOCINA.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	43
CAPÍTULO 3. HORMÔNIOS DO PÂNCREAS.....	51
INSULINA.....	51
QUÍMICA DA INSULINA.....	53
BIOSSÍNTESE DA INSULINA.....	55
REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE INSULINA.....	57
TRADUÇÃO.....	60
GLUCAGON.....	66
SOMATOSTATINA.....	68
AMILINA.....	70
GRELINA.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	72
CAPÍTULO 4 - INSULINA: TRANSDUÇÃO DE SINAL.....	87
INTRODUÇÃO.....	87
ESTRUTURA E FUNÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA.....	89
O SISTEMA IRS DE SINALIZAÇÃO.....	92

PROTEÍNAS ShC	94
INTERNALIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA.	
ENDOSSOMOS	96
ENDOCITOSE MEDIADA POR CLATRINA.....	97
ENDOCITOSE INDEPENDENTE DE CLATRINA	99
DEGRADAÇÃO DA INSULINA	99
BIBLIOGRAFIA	100
CAPÍTULO 5. - ESTRESSE OXIDATIVO	110
RADICAIS LIVRES	110
GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES	112
FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES A PARTIR DA CADEIA RESPIRATÓRIA	112
INIBIDORES DA CADEIA RESPIRATÓRIA.....	116
DISPONIBILIDADE DE EQUIVALENTES REDUTORES PARA A CADEIA RESPIRATÓRIA.....	117
RELAÇÃO ÓXIDO NÍTRICO E SUPERÓXIDO.....	125
NADPH OXIDASE.....	126
IMPLICAÇÕES DO NAD E METABOLISMO	127
ESTRESSE OXIDATIVO E RESISTÊNCIA A INSULINA	129
ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES.....	131
BIBLIOGRAFIA	131
CAPÍTULO 6- ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE DIABETES.....	139
VIA DO POLIOL	140
VIA HEXOSAMINAS.....	144
VIA DE FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA	148
FONTES EXÓGENAS.....	148
FORMAÇÃO DE AGEs.....	148
RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA	152
VIA DE ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE C	153
PROTEÍNA QUINASE C LATENTE	154
ATIVAÇÃO DE PROTEÍNA QUINASE C.....	155
INOSITOLTRIFOSFATO e DIACILGLICEROL.....	155
ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES.....	156
HIPOGLICEMIA.....	162
Modelo Cérebro-Glicose Sensitivo	163
Modelo Sangue-Glicose Sensitivo.....	163
METABOLÔMICA, PROTEÔMICA E DIABETES	163
METABOLÔMICA	163
PROTEÔMICA.....	164
MICRO-RNA E DIABETES.....	165
BIBLIOGRAFIA	166
CAPÍTULO 7- DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DE DIABETES.....	182
DEFINIÇÃO E CONCEITO DE DIABETES	182
DIAGNÓSTICO DE DIABETES	182
Métodos de Determinação da Glicose	182
BIOSSENSORES DA GLICOSE.....	185
BIOSSENSORES DE USO DIÁRIO	188
BIOSSENSORES NÃO INVASIVOS	189
DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DA SALIVA	189

LÁGRIMA E DETERMINAÇÃO DA GLICOSE	191
HEMOGLOBINA GLICADA.....	193
CLASSIFICAÇÃO DE DIABETES	197
DIABETES TIPO 1	198
DIABETES TIPO IDIOPÁTICA.....	200
DIABETES TIPO 2	200
DIABETES GESTACIONAL.....	201
OUTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES	202
DIABETES NEONATAL.....	203
BIBLIOGRAFIA	203
CAPÍTULO 8-TRANSPORTADORES DE GLICOSE	214
GLUT-1	216
GLUT-2.....	217
GLUT-3.....	218
GLUT-4.....	219
GLUT-5.....	223
GLUT-6.....	224
GLUT-7.....	224
GLUT-8.....	225
GLUT-9.....	226
GLUT-10.....	227
GLUT-11	228
GLUT-12.....	229
GLUT-13.....	229
GLUT-14.....	229
COTRANSPORTADORES DE SÓDIO E GLICOSE.....	229
SGLT-1	230
SGLT-2.....	231
SGLT-3	232
SGLT-4.....	233
SGLT-5	233
BIBLIOGRAFIA	233
CAPÍTULO 9: SECREÇÃO DE INSULINA	250
Pâncreas: Um Órgão exócrino e endócrino.....	250
MECANISMO DO PROCESSO SECRETOR.....	251
FATORES QUE INFLUENCIAM A SECREÇÃO	253
1.-Adenosina Monofosfato cíclico (cAMP).....	253
2.- Incretinas	254
3. Ácidos Graxos Livres.....	255
4. Glicina	259
INTERAÇÕES DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS COM OUTROS TECIDOS.....	259
EIXO CÉREBRO-ILHOTAS.....	260
EIXO FÍGADO-ILHOTAS.....	261
EIXO INTESTINO-ILHOTAS	262
CONTRIBUIÇÃO MITOCONDRIAL PARA A SECREÇÃO DE INSULINA	265
SUMOILAÇÃO	266
BIBLIOGRAFIA	267
CAPÍTULO 10 - METABOLISMO DA GLICOSE.....	281
MONOSSACARÍDEOS.....	281

METABOLISMO: CONCEITOS GERAIS	281
METABOLISMO BASAL	281
VIA GLICOLÍTICA	282
1. Isomerização da glicose-6-fosfato	285
2. Fosforilação da Frutose-6-Fosfato	286
3. Formação de Trioses-fosfatos	289
4. Reação da Triose fosfato Isomerase.....	290
5. Reação Catalisada pela Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase.....	291
6. Reação Catalisada pela Fosfoglicerato Quinase.....	291
7. Reação Catalisada pela Fosfoglicerato Mutase	292
8. Reação catalisada pela enolase.....	292
9. Reação catalisada pela piruvato quinase	293
METABOLISMO DO GLICOGÊNIO	294
Estrutura do Glicogênio.....	294
GLICOGÊNESE	295
GLICOGENÓLISE	298
GLICOFAGIA	300
VIA PENTOSE FOSFATO	300
Reação da 6-Fosfogliconolactonase	302
Fase não Oxidativa da Via Pentose Fosfato	302
GLICONEOGÊNESE	304
Regulação da gliconeogênese.....	307
CICLO DE KREBS	309
Reação Catalisada pela Piruvato Desidrogenase	309
Reação Catalisada pela Citrato Sintase	310
Reação Catalizada pela Aconitase	311
Reação Catalisada pela Isocitrato Desidrogenase.....	313
Reação Catalisada pela α -Cetoglutarato Desidrogenase	314
Reação Catalisada pela Succinato-CoA Sintetase	315
Reação Catalisada pela Succinato Desidrogenase.....	315
Reação Catalisada pela Fumarase.....	316
Reação Catalisada pela Malato Desidrogenase	316
Considerações Sobre o Metabolismo da Glicose	318
BIBLIOGRAFIA	319

PREFÁCIO

“A vida é uma simples questão de química”, escreveu o prêmio Nobel James Watson em seu livro DNA o segredo da vida. Seu trabalho, juntamente com Francis Crick foi um marco na ciência. O conhecimento da estrutura do DNA, o esclarecimento do fluxo de informações entre o gene e a proteína, a relação estrutura-função de muitas moléculas proteicas, bem como a revelação das vias anabólicas e catabólicas foram algumas das ações alcançadas pela Bioquímica. Isso possibilitou um melhor conhecimento sobre a composição química das células, suas funções nos sistemas biológicos e as alterações energéticas e químicas no curso da matéria viva. A dinamicidade da ciência é um fato, o armazenamento e subsequente utilização do conhecimento na área de saúde depende de outros conhecimentos como geração, tradução e disseminação desse conhecimento. A diabetes é uma doença caracterizada pela hiperglicemia, uma condição que afeta o metabolismo normal, principalmente o de carboidratos.

Fundamentos Bioquímicos de Diabetes é um livro que consiste em dez capítulos inter-relacionados, levando aos leitores as noções básicas de bioquímica para se estudar a doença diabetes. A patologia pode ser descrita como um desequilíbrio do sistema bioquímico normal, isto é, uma alteração da homeostase. A célula se constitui na base dos organismos vivos e local dos processos metabólicos, de modo que abordamos a célula e seus componentes sob o ponto de vista bioquímico. O conhecimento atual sobre a doença diabetes foi desenvolvida ao longo do tempo principalmente através de experimentos com animais. Então achamos por bem introduzir um capítulo tratando de modelos experimentais de diabetes. A insulina produzida pelo pâncreas é o hormônio diretamente relacionado com a doença, de modo que temos um capítulo sobre hormônios do pâncreas. Como a insulina atua ao se ligar com receptor, incluímos o capítulo transdução de sinal. Os radicais livres e sua relação com a doença é abordado no capítulo estresse oxidativo. Claro, não poderia faltar os aspectos bioquímicos de diabetes, onde são apresentadas as teorias correntes sobre a doença. A determinação da glicose para o diagnóstico de diabetes bem como a classificação da doença faz parte de um capítulo. A glicose é fundamental nos processos metabólicos de modo que são apresentados os transportadores de glicose. Como a insulina é secretada pelo pâncreas, os fatores implicados estão no capítulo secreção de insulina. Finalmente, sendo o metabolismo da glicose afetada pela doença, incluímos o capítulo metabolismo da glicose. O livro é útil para os estudantes de graduação, pós-graduação, pesquisadores e clínicos, da área de saúde (medicina, odontologia, enfermagem, fisioterapia e outros) e ciências biológicas, e para o entendimento da moléstia, bem como para as reflexões sobre a doença.

APRESENTAÇÃO

A descoberta da estrutura em dupla hélice do DNA por James Watson e Francis Creek, intensificou a pesquisa objetivando conhecer melhor o que se passa dentro da célula de um organismo vivo. James Watson escreveu em seu livro O DNA o segredo da vida que “ a dupla hélice é uma estrutura simples, mas a sua mensagem não poderia ser mais prosaica: a vida é uma simples questão de química”.

A vida é uma simples questão química, os avanços observados nas ciências, a torna uma forma dinâmica e rápida. A diabetes é uma doença muito disseminada e relevante para a área de saúde.

Fundamentos Bioquímicos de Diabetes é um livro que visa proporcionar subsídios e estimular reflexões sobre a doença. Com isso em mente o autor desenvolveu os capítulos baseando-se no desenvolvimento das pesquisas publicadas, objetivando oferecer aos alunos de graduação da área de saúde, o que se passa nas células de um organismo vivo, aos de pós-graduação um texto básico para consulta e aos pesquisadores oferecer um texto sobre o qual possam fazer reflexões e estabelecer problemas a serem investigados.

Em síntese a intenção do autor foi o de proporcionar com base nos trabalhos publicados os fundamentos bioquímicos para o estudo de diabetes.

CAPÍTULO 1 - CÉLULA: BASE DOS ORGANISMOS VIVOS

O conhecimento de que o DNA se constituía no carregador das informações genéticas intensificou os estudos para descobrir a sua estrutura. A revelação de James Watson e Francis Crick de que a molécula do DNA era formada por duas cadeias polinucleotídicas em dupla hélice abriu o caminho para se conhecer as reações que ocorrem dentro da célula. Nesse aspecto James Watson em seu livro DNA: o segredo da vida, escreveu: “a dupla hélice (DNA) é uma estrutura sucinta, mas sua mensagem não poderia ser mais prosaica; a vida é uma simples questão de química”. Baseado nessa assertiva nada mais justo do que entendermos primeiramente a arquitetura celular. Por que a palavra arquitetura? Essa palavra, arquitetura segundo os dicionários da língua portuguesa significa, disposição das partes ou elementos de um edifício ou espaço urbano, textura, projeto, propósito. Com base nesses sinônimos, podemos considerar a arquitetura celular como a disposição dos elementos numa célula, sua forma, seu propósito.

Muitas propriedades que caracterizam os organismos vivos, tais como comunicação, organização espacial e temporal, reprodução e adaptação a estímulos são também exibidas pelas células. A explicação biológica desse complexo fenômeno é frequentemente baseada em processos lógicos e informacionais [Nurse 2003]. Entendemos por célula como um espaço biológico limitado por uma membrana. São estruturas altamente dinâmicas, interagindo com o seu ambiente, sentido e respondendo a sinais químicos e estímulos biológicos, através de desenvolvimento, proliferação e envelhecimento [Yeung, Georges et al., 2005; Ingber 2003]. A célula contém estruturas, organelas tais como núcleo, mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, cada uma delas formando compartimento circundado por uma membrana. As membranas também formam uma rede tubular na célula o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi formando um espaço interconectado ou cisterna. A natureza lipoproteica das membranas coloca uma barreira que impede uma troca rápida de muitas células de um compartimento a outro. Tendo em vista que a vida é uma simples questão de química, neste ponto é interessante conceituarmos alguns termos muito usados quando se estuda o ser vivo.

METABOLISMO: Em seu sentido mais amplo, o termo metabolismo remete às reações químicas, que ocorrem nos sistemas vivos, através dos quais há a produção de material e energia essenciais ao ser vivente. Em outras palavras, metabolismo é o nome que se dá ao processo geral, por meio do qual os sistemas vivos adquirem e utilizam energia necessária para a realização de suas funções. Assim o fazem, acoplando reações exergônicas (aquelas reações químicas que liberam energia) da oxidação dos nutrientes com os processos endergônicos (aquelas reações químicas que requerem energia) necessários para manter o estado vivo, tais como a realização de trabalho mecânico, transporte ativo de moléculas e biossíntese de moléculas complexas. Todas as transformações que ocorrem no ser vivo são reguladas, de tal maneira a estabelecer um equilíbrio, dito equilíbrio dinâmico.

As vias de reações que compreendem o metabolismo são de modo geral, divididos em duas categorias: a degradação (catabolismo) e a síntese (anabolismo). O catabolismo ou degradação refere-se a quebra de nutrientes ou constituintes celulares de modo a salvar seus componentes e ou gerar energia. O anabolismo ou biossíntese envolve a síntese (formação) de biomoléculas a partir de componentes simples. A energia que o processo anabólico requer é fornecido pelo processo catabólico, em grande parte na forma de adenosina trifosfato (ATP). Portanto, podemos concluir que o acoplamento entre os processos, anabólico e catabólico se faz mediante o ATP.

HOMEOSTASE: O corpo humano é um organismo complexo. As funções exercidas por uma célula ou tecido dependem do meio ambiente que o rodeia. É desse meio ambiente que ele obtém o nutriente que lhe é essencial. Da mesma forma, que esse meio ambiente fornece o nutriente essencial ele remove os produtos de excreção. Dessa forma, a composição das

células vivas é notavelmente constante, desde que o meio ambiente seja normal. Portanto, o meio ambiente, representado pelo fluido intersticial pode sofrer variações devido a ingestão de alimentos, o que leva o corpo a reagir para restaurar a concentração do fluido intersticial. A manutenção do ambiente interno estável é conhecida como homeostase. Assim, a homeostase pode ser definida como a tendência de um organismo ou tecido de manter sua integridade diante de um ambiente em constante mudança. Em outras palavras, o próprio organismo é capaz de regular as reações que ocorrem em seu metabolismo. Há que considerar, que se estabelece um estado de equilíbrio entre um determinado tecido ou estrutura e o ambiente que o rodeia. A quebra desse estado de equilíbrio, facilita a instalação de moléstia.

EQUILÍBRIO DINÂMICO: O equilíbrio dinâmico se constitui num ponto crucial para que possamos compreender as alterações que aparecem no sistema bioquímico normal. Todas as moléculas do nosso organismo são sintetizadas, exercem suas funções durante um determinado período para serem posteriormente degradadas. Talvez esse conceito fique mais claro, se fizermos uma analogia, embora grosseira, com uma caixa de água residencial. A capacidade de uma caixa de água, seja de 500 litros, 1000 litros ou outro volume qualquer, não importa o quão grande, ela é mantida sempre com o volume constante. A medida que a água vai sendo consumida, a bóia que controla o nível da mesma permite a entrada de água em substituição aquela consumida. Logo, sempre haverá uma renovação de água embora o volume permaneça o mesmo.

Voltando ao caso das moléculas do organismo, como já nos referimos anteriormente, elas são sintetizadas, exercem suas funções durante um certo tempo e então são degradadas. Dessa forma, existe um tempo médio de vida para os constituintes do organismo. O equilíbrio entre os processos de síntese e degradação reflete bem o equilíbrio dinâmico.

SISTEMA TAMPÃO: Uma solução tampão é aquela capaz de resistir a uma alteração do pH do meio. O pH é uma notação química para expressar a concentração de íons hidrogênio. Por definição, pH de uma solução é o logaritmo do inverso da concentração hidrogeniônica:

$$\text{pH} = \log 1/[\text{H}^+] \quad \text{ou} \quad \text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

O pH varia na escala de 1 M a 10^{-14} M, sendo o pH 7, o da neutralidade. O pH acima de 7 indica uma solução alcalina, enquanto, que o pH abaixo de 7 indica uma solução ácida.

Dissemos acima, que uma solução tampão é aquela capaz de resistir a alterações do pH em qualquer sentido, isto é, se aumenta a concentração de ácido ou base, ela consegue neutralizar. Isto porque, um sistema tampão consiste em um ácido fraco e seu conjugado base. Um ácido fraco é aquele que se dissocia muito pouco em água. Por exemplo, o ácido carbônico (H_2CO_3) é um ácido fraco, importante na homeostase de animais. Ele é importante no controle do pH de mamíferos. Nos tecidos, devido ao metabolismo, o gás carbônico (CO_2) está sendo constantemente produzido, e constantemente sendo removido pelos pulmões. Se esse CO_2 não for eliminado do corpo, ele se acumula levando a condição de acidose respiratória. Isto porque o CO_2 quando dissolvido num sistema aquoso (e o conteúdo celular é um sistema aquoso) está envolvido nas seguintes reações:



O sistema $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ é importante para a manutenção da homeostase do pH nos animais. Por exemplo, o sistema tampão do sangue mantém o pH desse meio por volta de 7,40. A produção de

ácido pela célula, leva a uma acidificação do sangue onde o $[H^+]$ é tamponado por diferentes bases, incluindo o HCO_3^- , hemoglobina e HPO_4^{2-} . Se as bases forem consumidas nesse processo, ocorre a perda do poder tampão e como consequência o pH ácido irá predominar. O pH sanguíneo reflete as alterações de pH que ocorrem nos tecidos e valores abaixo de 7,35 indica um estado de acidose, enquanto o pH acima de 7,45 indica um estado de alcalose. A acidose metabólica pode ocorrer pelo excesso de produção de ácidos orgânicos (como por exemplo o ácido lático e corpos cetônicos) ou perda de bicarbonato. Já a alcalose metabólica ocorre de modo geral pela retenção de bicarbonato (HCO_3^-). Portanto, a medida do pH sanguíneo é importante para nos dar informações da situação ácido/base.

CÉLULA - UM SISTEMA AQUOSO

Nas células o transporte de nutrientes, as reações do metabolismo catalisadas por enzimas, bem como, as transferências de energia química são realizadas por ser um ambiente aquoso. Portanto, a água constitui um ambiente crucial para as funções exercidas pela célula. Essa importância pode ser inferida examinando-se os seguintes dados: um adulto, pesando aproximadamente 70 Kg, apresenta cerca de 70% de água (49 litros), assim distribuídos; 14 litros representando a água extracelular, dos quais 35 litros são do plasma e 11 litros são do fluido intersticial e linfa. Dessa forma, a água intracelular compreende 35 litros ((49 – 14) = 35). A quantidade de água requerida pelo corpo humano é determinada pela quantidade necessária para fornecer o volume e a concentração osmótica adequados aos fluidos corporais e para compensar a perda pela excreção através dos rins, pele, pulmões e intestino.

O fato da molécula da água (H_2O) ser altamente polarizada confere propriedades que lhe possibilita exercer importantes funções no âmbito celular. Na realidade, a água é um dipolo, isto é, ela apresenta uma fração de carga negativa e uma fração de carga positiva, o que faz com que a água possa dissolver rapidamente sais, como por exemplo o cloreto de sódio ($NaCl$). Por outro lado, sua tendência para formar ligação de hidrogênio com grupos hidroxilas de açúcares, alcoóis ou o grupo carbonila de aldeídos e cetonas, lhe confere a propriedade de dissolver muitos compostos orgânicos neutros com grupos funcionais polares. Por tudo isso, a água é conhecida como dissolvente universal.

Numa célula, além da água encontramos íons, como Na^+ , K^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , HCO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} e outros, moléculas de baixo peso molecular como carboidratos, ácidos orgânicos, peptídeos, lipídeos, nucleotídeos, além de macromoléculas como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos.

CÉLULAS DE MAMÍFEROS: ARQUITETURA CELULAR

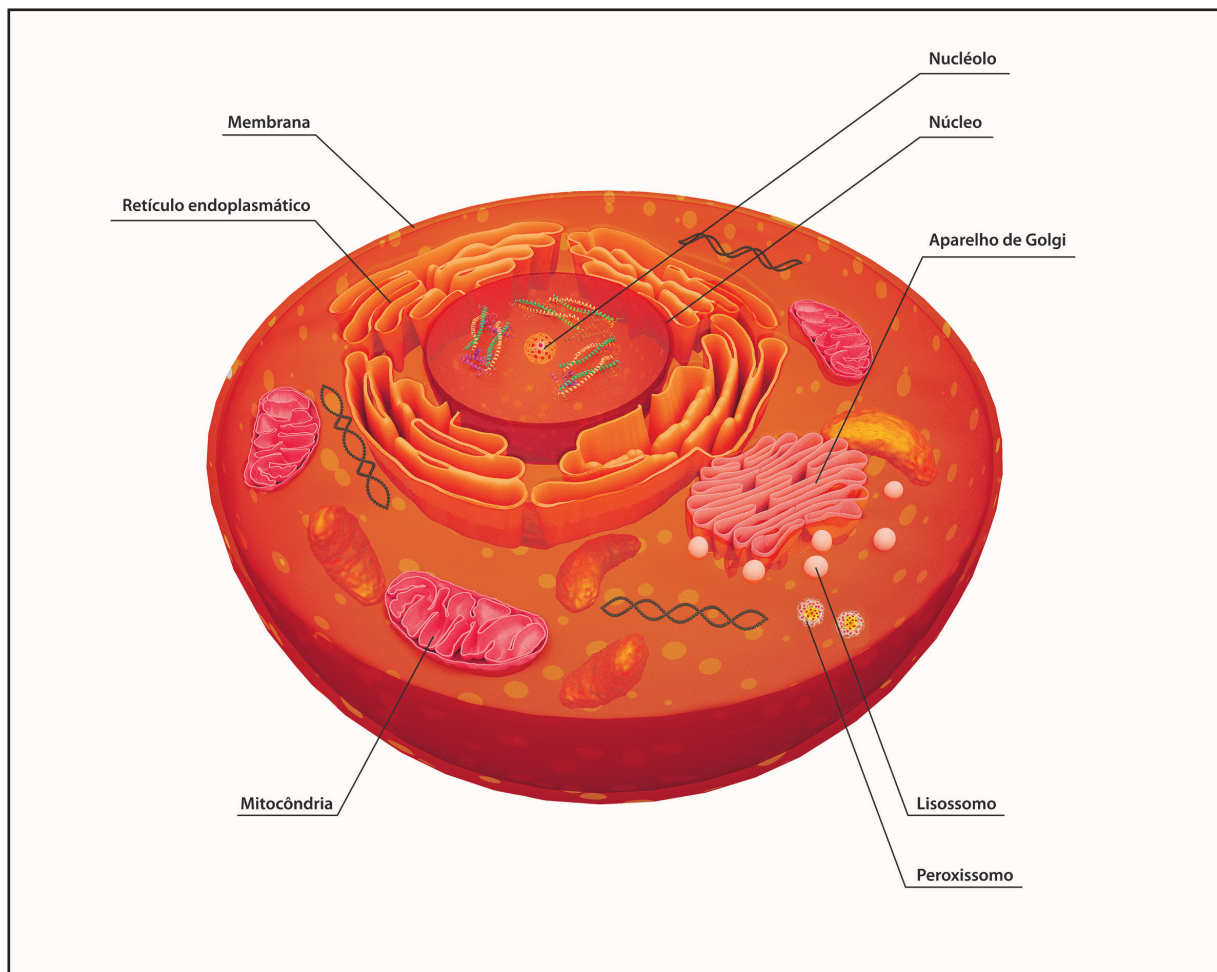
Mecanismos específicos nas membranas controlam as concentrações, tanto de moléculas pequenas, quanto de moléculas grandes, nos vários compartimentos da célula.

MEMBRANA PLASMÁTICA

Todas as células são individualizadas por uma membrana citoplasmática, que cria um compartimento interno onde ocorrem importantes funções.

A membrana plasmática é uma estrutura que limita o espaço celular. Pela sua superfície

Figura 1.1 - Representação esquemática de uma célula de mamífero com os seus constituintes



externa está em contato com o ambiente externo da célula, enquanto a superfície interna está em contato com o ambiente intracelular. Poderíamos projetar, que as membranas teriam a única função de delimitar o espaço celular e o das organelas. Na verdade, as membranas funcionam na organização dos processos biológicos, compartimentalizando esses processos, determinando a forma da célula.

As membranas são formadas por bicamadas lipídicas, com lipídeos anfipáticos (que contém uma região hidrofóbica e outra hidrofílica) e colesterol, orientados de tal forma que sua porção hidrofóbica interage entre si para minimizar o contato com água e outros grupos polares. Os grupos polares estão na interface com o ambiente aquoso. As membranas biológicas são constituídas por uma mistura complexa que varia com a fonte e a dieta.

As proteínas se distribuem na superfície ou estão imersas na bicamada lipídica e podem se difundir lateralmente na bicamada. Os lipídeos se distribuem de forma assimétrica nas membranas biológicas. Em cada camada observa-se composição diferente de glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos. Os glicerofosfolipídeos são moléculas anfipáticas, contendo um terminal polar e outro não polar. O grupo polar é constituído por um fosfato, o qual, no pH 7,0 é carregado negativamente. Tanto a colina, quanto a etanolamina glicerofosfolipídeos, apresentam uma carga negativa, no fosfato e uma carga positiva no nitrogênio, formando o chamado “zwitterion”. A parte não polar dos glicerofosfolipídeos são formados pelas cadeias hidrocarbonadas hidrofóbicas de ácidos graxos.

Outro componente de membranas é o colesterol, uma molécula hidrofóbica, cuja presença na membrana altera a fluidez e reduz a permeabilidade. Outros componentes de membranas são os esfingolipídeos, cuja base molecular é a esfingosina e a dehidroesfingosina. As esfingomielinas, o mais abundante dos esfingolipídeos nas células de mamíferos tem uma radical fosforilcolina esterificado na posição C1. Também, derivado da esfingosina temos os glicolipídeos, isto é, lipídeos contendo um ou mais unidades de carboidrato. O glicolipídeo mais simples é o cerebrosídeo, que contém um único resíduo de carboidrato, ou glicose ou galactose.

As proteínas presentes nas membranas biológicas são classificadas em duas categorias: (a) proteínas integrais ou intrínsecas, que estão ligadas fortemente às membranas, das quais podem ser separadas somente por tratamento com solventes ou detergentes, e (b) proteínas periféricas ou extrínsecas, as quais são dissociadas das membranas por procedimentos suaves, deixando a membrana intacta. As proteínas podem estar expostas a determinada superfície da membrana, enquanto outros atravessam a membrana, sendo conhecidas como proteínas transmembranas.

A formação de membranas é uma consequência da natureza anfipática das moléculas. Já vimos anteriormente que uma molécula anfipática é aquela que contém um grupo polar (hidrofílico) e uma cadeia não polar (hidrofóbica). A pergunta que vem a nossa mente é: por que essas moléculas formam uma camada bipolar em meio aquoso? Em um meio aquoso, essas moléculas podem formar micelas, uma estrutura globular em que os grupos polares interagem com água e as cadeias hidrofóbicas interagem entre si. Alternativamente, elas podem formar uma bicamada, um fato de importância biológica. A formação da bicamada é um processo de auto associação. As interações hidrofóbicas se constituem na força guiadora para a formação da bicamada lipídica. As proteínas presentes nas membranas apresentam uma variedade de funções: estrutural para manter a forma da célula; como receptores para interagir com o agonista específico e fatores de crescimento; como facilitadores de movimentos de solutos e íons através da membrana; e como enzimas envolvidas na transdução de sinais. Já vimos que as proteínas podem ser classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas integrais são incrustadas na membrana com orientação definida. O segmento transmembrana dessas proteínas apresenta estrutura helicoidal (estrutura secundária). Como vimos anteriormente, as proteínas integrais são aquelas firmemente ligadas às membranas por forças hidrofóbicas, e sua separação só é possível empregando-se agentes que rompem as membranas. Por outro lado, as proteínas periféricas ligam-se às membranas por interação eletrostática, de ligações de hidrogênio. Dessa forma elas podem ser dissociadas da membrana por procedimentos suaves, que deixa a membrana intacta, como por exemplo soluções salinas de alta força iônica, agentes quelantes de metais ou alteração de pH.

A membrana apresenta uma estrutura dita “modelo fluído de mosaico”. A teoria desse modelo postula que as proteínas integrais se assemelham a “iceberg” flutuando no mar de lipídeos e que estas proteínas são capazes de livremente se difundir lateralmente na matriz lipídica, exceto quando seus movimentos são restringidos pela associação com outros componentes celulares. Diante do exposto, podemos fazer as seguintes considerações: todas as células são individualizadas por uma membrana, chamada membrana plasmática. Esta membrana limita o citoplasma, formando um compartimento onde funções essenciais são realizadas. Além do seu papel como uma barreira física, que mantém a integridade da célula, ela possibilita que a célula possa executar funções vitais, como por exemplo, exclusão de substâncias lesivas, aquisição de nutrientes, eliminação de materiais que não são usados e materiais tóxicos.

Uma característica comum a todas as membranas lipídicas é a presença de moléculas anfipáticas, isto é, com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Devido a sua natureza anfipática, as membranas lipídicas exibem somente solubilidade em solução aquosa.

A permeabilidade em uma membrana pode ser passiva, isto é, a molécula atravessa a

membrana livremente. A velocidade de penetração depende da solubilidade em lipídeos. A permeabilidade de moléculas através de uma membrana depende do coeficiente de partição (K), do coeficiente de difusão (D) e da espessura da membrana (E):

$$P = KD/E$$

O coeficiente de partição é dado pela relação entre a concentração na fase lipídica e a concentração na fase aquosa. O coeficiente de difusão é a velocidade com que as moléculas atravessam a membrana considerando várias concentrações externas. Moléculas de mesmos tamanhos penetram mais rapidamente quando a solubilidade em lipídeos for maior; se a solubilidade for igual, as moléculas menores entram mais rapidamente. As moléculas que se dissolvem na fase lipídica são chamadas lipofílicas.

Outras moléculas necessitam de energia para vencer a barreira lipídica da membrana. Se a molécula for polar necessita de um canal para penetrar na célula. Este tipo chama difusão facilitada, uma vez que a passagem é facilitada pela existência de um canal. Muitas vezes a molécula deve se mover contra um gradiente de concentração e isto requer gasto de energia. As proteínas da membranas são capazes de utilizar uma fonte de energia para movimentar as moléculas contra o gradiente de concentração. Este procedimento que requer gasto de energia é chamado transporte ativo. As células devem controlar a concentração de sais no seu interior para evitar condições desfavoráveis. Por exemplo, muitos animais, contém alta concentração de K^+ e baixa concentração de Na^+ . Este gradiente iônico é gerado pelo sistema de transporte específico, a enzima $Na^+ K^+$ ATPase. Essa enzima hidrolisa o ATP (adenosina trifosfato), uma molécula que armazena energia, para fornecer a energia necessária para guiar o Na^+ para fora da célula e o K^+ para dentro.

FUSÃO DE MEMBRANAS

O tráfego intracelular é um processo muito comum, que ocorre nas células, sendo realizado por transportadores delimitados por uma membrana denominados de vesículas. A fusão de membranas das organelas é uma etapa crucial para os organismos vivos. Os processos vitais dependem da execução ordenada da fusão de membranas, bem como, da organização compartimental das células [Sudhof, Rothman 2009]. A reação de fusão intracelular de membranas requer que proteínas SNARE associadas a uma membrana se ligam a proteína SNARE de outra membrana. As proteínas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fator attachment protein receptors*), constituem uma família de pequenas proteínas conservadas em eucariotas que modulam o processo de fusão [Jahn, Cafiso, Tamm 2024; Ungar, Hugos 2003]. As proteínas SNARE foram identificadas na década de 1980, a partir da purificação de duas proteínas, um fator sensível a etilmaleimida (NSF) e outra solúvel de ligação a NSF, SNAP (*Soluble NSF Attachment Protein*), as quais atuam nas vias de tráfego intracelular [Block, Glick, Wilcox et al., 1988; Clary, Griff, Rothman 1990]. A NSF se mostrou necessária para o processo de fusão visto que sua inibição provocava o acúmulo de vesículas [Malhotra, Orci, et al., 1988]. Esse achado foi importante, pois utilizando purificação por afinidade, foi possível detectar receptores superficiais para essas proteínas. Os receptores foram denominados de SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fator Attachment protein Receptor*), também conhecido como receptor de SNAP [Rothman 2014]. As proteínas SNARE estão presentes na membrana das vesículas, conhecida como V-SNARE ou R-SNARE, bem como na membrana plasmática, conhecidas como T-SNARE ou Q-SNARE [Bennett, Calakos, Scheeller 1992; Sudhof, Baumert et al., 1988]. Enquanto o processo geral de fusão é energeticamente favorável, o seu processamento se faz através de vários intermediários [Risselada, Mayer 2020; Chemomordik, Kozlov 2008; Cohen, Melikyan 2004]. O processo

de fusão tem início com a aproximação das duas membranas para contato excluindo água e proteínas. A montagem do complexo SNARE entre as duas membranas é uma etapa chave para a fusão modulada pela proteína SNARE. Para isso as proteínas SNARE localizadas nas duas membranas (vesícula e plasmática) precisam interagir em reações de montagem do complexo SNARE, responsável pelo processo de fusão. A montagem requer a participação de quatro motivos (motifs) diferentes do SNARE (motivo ou motifs é um fragmento de cerca de 60 resíduos de aminoácidos apresentando determinada função). Forma-se então um complexo trans-SNARE, constituído por um SNARE de quatro classes diferentes: V ou R SNARE da vesícula e 3 SNAREs t ou Qa, Qb, Qc-SNARE da membrana alvo. Esse processo tem o suporte de proteínas SM (Sec1/Munc18). Para prevenir que haja montagem promíscua de SNARE, as proteínas SM agem como supervisoras (Chaperonas ou acompanhantes) da montagem de complexos trans-SNARE cognatos produtivos [Zhang, Hughson 2021]. Após a fusão, as proteínas SNARE são alinhados paralelos, começando pela extremidade N-terminal e progredindo ao C-terminal, Cis-SNARE (um processo conhecido por zippering ou zíper) e necessitam ser ativados para a dissociação ou desmontagem, fase que requer energia [Sollner T, Beene et al., 1993], mediado por NSF-ATPase. Podemos resumir o que ocorre da seguinte maneira [Rothman 2014]: (1) A fusão guiada pela proteína SNARE é rápida e espontânea; (2) As proteínas SNAREs doam em feixe de quatro hélices altamente estáveis durante a fusão; (3) Um único complexo SNARE é suficiente para a fusão da bicamada; (4) Energia liberada no dobramento da SNARE é usada para fazer trabalho sobre a camada bilipídica e (5) Os SNAREs são então reciclados pela NSF-ATPase que os desdobra ou desmonta.

Física da Fusão da Bicamada: A formação e fusão das bicamadas é governada pelo efeito hidrofóbico que causa forças minimizando as superfícies não polares expostas ao solvente [Jahn, Grubmuller 2002]. A aplicação desse conceito aos intermediários da fusão sugere que a fusão processa com a formação de uma haste. De acordo com essa hipótese a fusão de lipídeos da membrana requer: 1-aproximação; fusão da estrutura monocamada lipídica; formação de uma haste e expansão da haste. Para a fusão se processar cada uma dessas etapas devem ser guiadas por um gradiente de energia. Essa haste hipótese se baseia na observação que a fusão das monocamadas proximais precede a fusão das monocamadas distais, que por sua vez precede a troca de solvente intravesicular [Jahn, Grubmuller 2002].

NÚCLEO

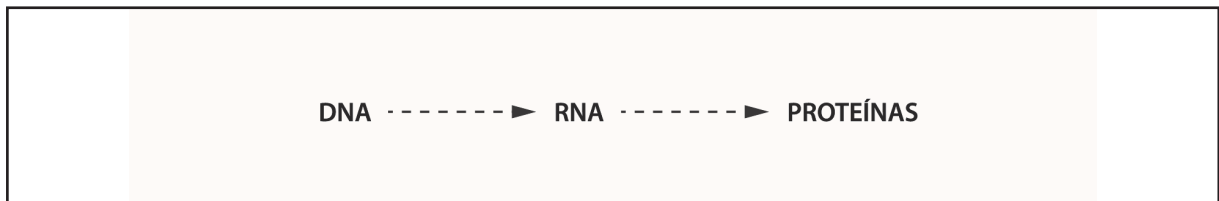
O núcleo é uma organela responsável pela informação genética. É uma característica das células eucariotas. Estas incluem organismos simples como levedura e fungos, bem como, animais multicelulares.

O núcleo é delimitado por uma membrana bem definida e contém a maior parte do DNA celular. A informação genética é codificada na sequência de bases da molécula do DNA, que forma os cromossomos, característicos de cada espécie. A membrana nuclear contém numerosos poros que regulam o fluxo de matéria entre o núcleo e o citoplasma.

Nas células eucariotas o DNA está associado a várias proteínas formando a cromatina. As histonas se constituem nas proteínas mais numerosas nas cromatinas. O DNA um ácido nucléico são polímeros de cadeia longa compostos de nucleotídeos. A sequência de nucleotídeos é o repositório de toda a informação genética dos cromossomos. Dois tipos quimicamente diferentes de ácidos nucleicos devem ser considerados: o ácido desoxiribonucleico (mais conhecido como DNA) e o ácido ribonucleico (mais conhecido como RNA). Cada nucleotídeo contém uma base nitrogenada de natureza purínica ou pirimidínica, um carboidrato, a ribose no RNA e a

desoxirribose no DNA e um grupo fosfato.

As bases purínicas são representadas pela adenina e guanina, enquanto as bases pirimidínicas são representadas pela citosina e timina. A sequência de bases ao longo da cadeia do DNA, dá origem a informação genética, isto é, as instruções para o arranjo dos aminoácidos na cadeia polipeptídica das proteínas. O DNA nas células de eucariotas está associado a várias proteínas para formar a cromatina. Está na interface é amorfa e dispersa. Antes da divisão celular ela se torna organizada em estruturas compactas chamadas cromossomos. Na realidade, os cromossomos de eucariotas consistem em um complexo de DNA, RNA e proteínas e variam com o estágio do ciclo celular. O RNA é um intermediário no fluxo da informação genética. Vamos lembrar que o fluxo da informação genética se inicia no DNA, passa para o RNA e deste para proteínas.



Enquanto a estrutura do DNA foi descrita por Watson e Crick como uma dupla hélice, a do RNA é um polímero linear, em que o carboidrato é a ribose e uma das bases nitrogenadas é o uracil no lugar da timina.

Entre os papéis desempenhados pelo RNA destacamos: intermediário do fluxo da informação genética, a partir do DNA. O DNA é copiado ou transcrito no RNA mensageiro (mRNA) e este é traduzido a proteínas; molécula de RNA serve como adaptadores, que traduzem a informação existente na sequência de ácidos nucleicos do mRNA em informação, determinando dessa forma a sequência de aminoácidos de proteína sendo sintetizada, e por último o RNA é um importante componente dos ribossomos, que realiza o processo de tradução.

A expressão da informação genética compreende duas etapas, a transcrição em que o DNA serve como molde para a síntese da cadeia de RNA. A segunda etapa é a tradução, em que os ribossomos ligam os aminoácidos, com o auxílio de enzimas. Como já vimos, a ordem de entrada dos aminoácidos para formar a cadeia polipeptídica é ditada pela sequência das bases do RNA. No núcleo existe um sub compartimento, o nucléolo, onde o ribossomo é sintetizado.

MITOCONDRIA

A mitocôndria é uma organela celular, que durante muito tempo foi considerada ter somente a função de produzir energia para a célula. No entanto, evidências revelam que essa organela está envolvida em vários outros processos fisiológicos, tais como apoptose, autofagia, sinalização redox, homeostase do cálcio e reprogramação das células tronco [Tilokani, Nagashima et al., 2018; Rambold, Pearce 2018; Giacomello, Pyakurel et al 2020]. A mitocôndria é delimitada por duas membranas, uma membrana mitocondrial interna, IMM (*inner mitochondrial membrane*) e outra membrana externa, OMM (*outer mitochondrial membrane*), caracterizadas por composição e função diferentes. A membrana externa pode ser dissociada da membrana interna por ruptura osmótica [Ernster, Drahota, 1969]. Uma diferença que se percebe é a presença do lípido cardiolipina, enquanto na membrana externa apresenta um teor baixo, na membrana mitocondrial interna o teor é alto. As duas membranas diferentes na aparência, composição e funções bioquímicas, limitam um espaço interno dito mitossol. Enquanto a membrana mitocondrial interna (IMM) está implicada na conversão de energia mitocondrial, a membrana externa (OMM) é a plataforma para os processos de sinalização.

A IMM delimita o lúmen ou matriz mitocondrial e pode ser dividido em IMM limitante correndo paralelo a OMM, e a crista, invaginação que fornece a expansão da área superficial, tendo a maquinária responsável pela respiração mitocondrial. A estrutura da crista varia de tubular a laminar, dependendo do tecido e estado funcional da membrana.

O OMM é uma membrana lisa, geralmente permeável, limitando a difusão de moléculas maiores do que 5000 Da que forma interfaces com outros compartimentos subcelulares, incluindo o retículo endoplasmático, lisossomos, peroxissomos, endossomos. As cristas de IMM são os sítios de fosforilação oxidativa, já que o complexo implicado na respiração mitocondrial, isto é, cadeia respiratória e ATP sintase [Frey, Mannella 2000; Vogel, Bornhord et al., 2000]. Portanto, a função primária da membrana mitocondrial interna é a bioenergética, onde a energia armazenada nos equivalentes redutores produzidos no ciclo de Krebs é usada para a síntese de a ATP. A produção de ATP é garantida pela organização da crista, minimizando a difusão de metabolitos [Demongeot J, Glade et al., 2007]. Já na OMM são encontradas proteínas importantes para a fisiologia celular, tais como as translocases, responsáveis pelo transporte de precursores proteicos mitocondriais, proteínas responsáveis pela ligação da mitocôndria a sítios específicos de outros compartimentos subcelulares e proteínas que coordenam a transdução de sinal com a função mitocondrial.

O número de mitocôndrias nas células varia, de acordo com a condição física do indivíduo. Nos indivíduos sedentários o número de mitocôndrias é menor do que nos indivíduos afeitos a exercícios físicos.

A mitocôndria tem a capacidade de alterar a sua morfologia, número e função em respostas a vários estímulos [Scarpulla 2002]. Logo, a mitocôndria pode modular sua morfologia para criar uma rede tubular coordenada pelos eventos de fusão e fissão. As alterações dessas alterações mitocondriais são referidas como dinâmica mitocondrial. Em outras palavras, a natureza das alterações que envolvem sua morfologia e distribuição subcelular é coletivamente conhecido como dinâmica mitocondrial [Liesa, Palacin, Zorzano 2009]. Dois mecanismos principais da dinâmica da membrana mitocôndria são fusão e fissão [Giacomello, Pyakurell et al., 2020].

Fusão Mitocondrial: esse processo é regulado por duas proteínas pertencentes a família relacionada a dinamina-GTPase, chamadas mitofusinas (MFN-1 e MFN-2) e bem como a proteína oftálmica atrófica (OPA-1). O início da fusão ocorre pela ancoragem de duas moléculas de mitofusinas MFN-1 em trans. Após a ancoragem, há a indução de alterações conformacionais, as quais promovem a hidrólise de GTP levando a fusão de dois OMM.

Fissão Mitocondrial: esse processo é primariamente realizado pela proteína-1 relacionada a dinamina (DRP-1), que desfosforilada pela calcineurina se desloca do citosol à mitocôndria, ligando-se ao seu receptor na OMM, ao fator de fissão mitocondrial de 49 KDa e 51 KDa. Após a ligação a DRP-1 oligomeriza e guia a fissão.

Neste ponto seria importante abordarmos a biogênese das mitocôndrias. Biogênese mitocondrial pode ser definida como o crescimento e divisão de mitocôndria pré-existente [Jornayvaz, Shulman 2010]. Tanto o genoma nuclear quanto o genoma mitocondrial codificam as proteínas mitocondriais. O DNA mitocondrial (mitDNA) é uma molécula que apresenta forma circular sendo constituída por cadeia dupla. Também, encontramos na mitocôndria outros produtos do gene mitocondrial. Dentre esses produtos destacamos o RNA de transferência (tRNA) e o RNA ribossômico (rRNA).

A biogênese mitocondrial é um processo regulado por fatores, que inclui PGC-1 α (*PPAR* = *Peroxisome Proliferation-Activated Receptor Coactivator -1 α*) descoberto após os fatores respiratórios 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2) e o fator de transcrição mitocondrial (TFam).

PGC-1 α é um fator de regulação co-transcricional, que age induzindo a biogênese mitocondrial, ativando diferentes fatores de transcrição, incluindo NRF-1 e NRF-2, que promovem a expressão do TFam [Puigserver, Wu et al., 1998]. Outro importante regulador da biogênese mitocondrial é a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) o qual regula o metabolismo energético intracelular, em resposta a uma crise energética aguda [Hardie 2007]. Ainda entre outros reguladores da biogênese da mitocôndria, destacamos a proteína quinase IV – dependente de calmodulina [Wu, Kanatous et al., 2002]. As mitocôndrias constituem-se num sistema de sensores, que respondem de forma dinâmica às necessidades energéticas, fornecem precursores sintéticos e por consequência regulam diversos processos como proliferação [Li. Li et al., 2015], respostas imunes [Kim, Kim et al., 2015], apoptose [Kuo, Chin et al., 2015] e viabilidade celular [Radogna, Albertini et al., 2015].

LISOSSOMOS

Lisossomos são organelas, de animais e plantas, circundadas por uma membrana. Essas organelas variam na forma, tamanho e número numa célula, e apresentam enzimas glicoprotéicas, as hidrolases, portanto constituem-se num compartimento, dito digestivo.

Os lisossomos são os responsáveis pela degradação de proteínas em aminoácidos, polissacarídeos em monossacarídeos e lipídeos complexos em ácidos graxos. [Huotari, Helenius 2011]. Nessas organelas, são encontradas uma variedade de enzimas hidrolíticas, tais como lípases, proteases e glicosidases, que atuam na degradação catabólica [Kolter, Sandhoff 2005]. Os produtos de degradação, os catabólicos lisossomais, são transportados para fora dos lisossomos através de transportadores específicos [Ruivo, Anne et al., 2009], ou então por meio de tráfego de membrana vesicular, para homeostase de energia ou então reutilização em vias biossintéticas [Saftig, Klumperman 2009].

Os lisossomos são limitados por uma bicamada fosfolipídica simples [Saftig, Schroder, Blanz 2010]. A membrana lisossomal apresenta alto conteúdo de carboidratos devido a proteínas glicosiladas. Glicosilações no seu domínio luminal forma um glicocálice que é sugerido proteger a membrana das enzimas proteolíticas dentro dos lisossomos [Granger, Green et al., 1990]. A palavra grega lisossomos significa corpo digestivo, e realmente a função dessas organelas é a degradação. O ambiente ácido do lúmen lisossomal com um pH entre 4,5 e 5,0 facilita o processo degradativo. Essa faixa de pH é considerada o pH ótimo de ação das enzimas hidrolases, além de preparar as estruturas das moléculas para o processo degradativo [Coffey, De Duve 1968]. As vias degradativas dos lisossomos foi tido como um meio das células se livrarem de produtos descartáveis, isto é, produtos que precisam ser eliminados. Contudo, tem se tornado claro que estas vias catabólicas são necessárias para uma função mais ampla, incluindo regulação da sinalização celular, metabolismo e degradação de proteínas tóxicas, bem como, de organelas danificadas e “clearance” de patógenos [Huber, Teis 2016]. Além das reconhecidas funções dos lisossomos como um centro de reciclagem para geração de nutrientes, as membranas lisossomais parecem monitorar a energia intracelular e o estado de nutrientes extracelular [Cang, Bekele, Ren 2014].

Um aspecto que pode levantar dúvidas no leitor é o seguinte: sendo uma organela dita digestiva e contendo uma variedade de enzimas hidrolíticas, por que a membrana que a limita não é digerida? Ocorre que a membrana lisossomal é constituída por uma bicamada simples, protegida das hidrolases ácidas pela expressão de proteínas de membrana específicas, tais como as LAMP-1 e LAMP-2 (*LAMP = Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 and 2*), as quais juntas constituem cerca de 50% do conteúdo protéico da membrana lisossomal [Wartosch, Bright, Luzio 2015].

Pela fagocitose as células envolvem microorganismos e vírus, pela pinocitose, envolvem líquidos e pela endocitose, envolvem proteínas específicas em processos mediados por receptores. Em cada caso, o material proveniente do exterior da célula é encapsulado em vesículas ligadas à membrana plasmática. Essas vesículas se fundem com os lisossomos primários para formar os lisossomos secundários ou endolisossomos, isto é, os vacúolos digestivos, os quais contêm o material a ser digerido. Os produtos da digestão são liberados dos lisossomos e reutilizados pela célula. Os materiais não digeridos se acumulam e são removidos da célula por exocitose [Watersch, Bright, Luzio 2015].

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O retículo endoplasmático é uma organela constituída de túbulos e que desempenha várias funções na célula. É uma organela primária para as vias secretoras em todas as células eucariotas [Schroder, Kaufman, 2005].

Seu tamanho e sua forma se alteram dependendo das necessidades da célula. É no retículo endoplasmático que as proteínas são dobradas, para suas estruturas, secundária, terciária ou quaternária, são sintetizadas, deslocadas e modificadas pós-tradução. Estas modificações, incluem a glicosilação, a formação de pontes dissulfeto (-S-S-) e o dobramento, cujo processo é mediado por enzimas ditas chaperones e foldases [Chang, Chang 2006; Hampton 2002]. O dobramento de proteínas é um processo essencial, para que possam exercer suas funções e a eficiência desse processo, para se arranjam em complexos multi-subunidades, antes de irem ao aparelho de Golgi, depende de condições ambientais, genéticas e metabólicas [Kaufman 2002]. O ambiente oxidante do retículo endoplasmático favorece a formação das pontes dissulfeto nas proteínas. Essas reações são catalisadas por enzimas, as proteínas dissulfeto isômerases (PDI). As reações que conduzem ao dobramento de proteínas são mediadas pelas “chaperones”, as quais requerem grande quantidade de Ca^{2+} intraluminal. Esse processo requer energia e o ATP é um requisito para o bom funcionamento de “chaperones” bem como, para manter os estoques de Ca^{2+} e a homeostase redox [Malhotra, Kaufman 2007].

Os ribossomos que ficam livres no citossol, podem ser direcionados ao retículo endoplasmático por uma sequência de sinal. Ligando ao retículo endoplasmático, formam o retículo endoplasmático rugoso. As cadeias de peptídeos nascentes formados pelos ribossomos do retículo endoplasmático, são deslocados através da membrana do retículo endoplasmático. No lúmen do retículo endoplasmático eles são glicosilados (incorporação de carboidrato na cadeia polipeptídica) e posteriormente modificados.

Muitas situações fisiológicas ou patológicas podem interferir com o dobramento das cadeias polipeptídicas e por conseguinte afetar a homeostase do retículo endoplasmático, como alteração do Ca^{2+} luminal, exaustão de energia, perturbação do sistema redox, falta de glicose, acúmulo de lipídeo, intoxicação por etanol [Malhi, Kaufman 2011; Chen, Melchior, Guo 2014; Cnop, Foulfelle, Velloso 2012].

APARELHO DE GOLGI

O aparelho de Golgi, também chamado complexo de Golgi é uma organela localizada na região perinuclear e é caracterizado por membranas empilhadas espacialmente e funcionalmente organizadas. Apresenta funções proeminentes no processamento, transporte e separação de proteínas recém-sintetizadas, derivadas do retículo endoplasmático [Nozawa, Fritzler, Chan

2005]. O complexo de Golgi pode ser diferenciado em três compartimentos: compartimento cis, localizado perto do retículo endoplasmático, por onde as proteínas sintetizadas nessa organela entram no aparelho de Golgi; compartimento medial e compartimento trans. Este último é por onde as proteínas saem para vários destinos.

O aparelho de Golgi, apesar de seu alto grau de organização se constitui em estruturas dinâmicas, por meio dos quais grandes quantidades de material secretório e membranas passam por elas para vários destinos [Barr, Short 2003]. Na superfície citoplasmática do aparelho de Golgi são encontradas proteínas espiraladas que recebem o nome de golginas [Nozawa, Fritzler, Chan 2005]. Originalmente, as golginas foram descritas como autoantígenos, identificados no complexo de Golgi, reconhecidos por autoanticorpos de pacientes com doenças sistêmicas autoimune [Fritzler, Hamel et al., 1993]. As golginas possuem uma característica estrutural que é a presença de longas regiões de uma espiral-espiralada (*coiled-coils*), formando uma estrutura semelhante a um bastão [Burkhard, Stetefeld, Strelkov 2001]. Essas espirais-espiraladas nada mais são do que feixes de α -hélices que são enroladas numa super-hélice. De um modo geral, consistem em 2 a 5 α -hélices anfipáticas, que se enrolam para formar uma super-espiral. Podem apresentar várias propriedades, incluindo estabilidade térmica de um lado ou labilidade relativa necessária para processos de redobramento; podem também estarem envolvidos em eventos de transdução de sinal, sistema de reconhecimento de moléculas, bem como, fornecer estabilidade mecânica para a célula [Burkhard, Stetefeld, Strelkov 2001].

Vesículas que se originam do aparelho de Golgi transportam proteínas, como hormônios, proteínas do plasma sanguíneo, enzimas digestivas para a membrana plasmática a fim de serem secretadas [Burkhard, Stetefeld, Strelkov et al., 2001].

A via exocitótica é responsável pela síntese, modificação e transporte de toda proteína secretória e de membrana ao longo do eixo do tráfego retículo endoplasmático---aparelho de Golgi---membrana plasmática. O aparelho de Golgi desempenha um papel central da via secretória; ele recebe os produtos do retículo endoplasmático, proteínas e lipídeos, os modificam e os entregam para os destinos finais. Dentre as modificações, podemos citar: glicosilação, sulfatação, fosforilação e proteólise [Zhang, Wang 2016].

PEROXISSOMOS

Descrito inicialmente como microcorpos, essas organelas foram posteriormente denominadas de peroxissomos, com base em suas funções, quando isoladas do fígado de rato e localizados as enzimas oxidases, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como a enzima catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio [De Duve, Baudhuin 1966].

Hoje, sabemos que muitas vias metabólicas de peroxissomos produzem peróxido de hidrogênio, e que a subsequente decomposição do agente tóxico pela catalase é um processo fundamental [Heiland, Erdman 2005]. Os peroxissomos contribuem para a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, oxidação de ácidos biliares e colesterol e síntese de glicerolipídeos, plasmalógenos e isoprenoides [Wanders 2004; Kovacs, Olivier, Krisans 2002; Kovacs, Krisans 2003].

Os peroxissomos são gerados ou pela divisão de peroxissomos pré-existentes [Lazarow, Fujiki 1985], ou sua formação de novo do retículo endoplasmático [De Duve, Baudhuin 1966; Kim, Hettema 2015].

As análises de alterações morfológicas sugerem que a proliferação de peroxissomos envolve processos como alongamento, constrição e fissão de peroxissomos [Honsho, Yamashita, Fujiki

2016; Schrader, Bonekamp, Islinger 2012]. Várias proteínas humanas foram identificadas, que desempenham um papel nesses diferentes processos, incluindo proteínas Pex 11, envolvida no alongamento e constrição e DLP1/DRp1, MFF, GDAP1 envolvidos na fissão de peroxissomos. A proliferação de peroxissomos é induzida pela ativação de um grupo de receptores nucleares chamados, PPAR (*peroxisome-proliferator-activated receptors*), que atuam como sensores de lipídeos [Hua, Kim 2016; Issemann, Green 1990].

Na formação de novo de peroxissomos a partir do retículo endoplasmático, três grupos de proteínas chamadas peroxinas estão envolvidas [Hua, Kim 2016]. Peroxinas são proteínas envolvidas na biogênese, divisão e herança de peroxissomos codificados pelos genes PEX [Meinecke, Bartsch, Wagner 2016]. A síntese de novo de peroxissomos a partir do retículo endoplasmático (RE), se inicia com uma remodelação do RE formando uma curvatura e a formação de subdomínios especializados no RE. Os componentes moleculares envolvidos neste processo não são conhecidos; Pex 16 é, provavelmente, um candidato devido a sua capacidade de recrutar as proteínas da membrana do peroxissomos diretamente do RE [Kim, Mullen et al., 2006]. São reconhecidos três peroxinas com a função específica na biogênese da membrana de peroxissomos: Pex 3, Pex 16 e Pex 19. Este último, é principalmente uma proteína citossólica, capaz de ligar diferentes proteínas de membrana de peroxissomos, PMP (*Peroxisome Membrane Protein*) e postulou-se que pode servir como receptor de PMP recém-sintetizado [Jones, Morrel 2004]. Pex 3 é uma proteína de membrana, que funciona como um atracadouro, para a importação de proteínas da membrana [Fang, Morrel et al., 2004].

Contrariamente, a mitocôndria ou cloroplastos, os peroxissomos são circundados por apenas uma membrana e não contém nem DNA nem ribossomos [Meinecke, Bartsch, Wagner 2016; van den Bosch, Schutgens et al., 1992]. Se os peroxissomos são desprovidos tanto de DNA quanto de ribossomos, como então essas organelas adquirem as proteínas da matriz? As proteínas da matriz peroxissomal são todas do citossol e são importadas pelas organelas sintetizadas pelos ribossomos livres. Dois sinais marcadores de peroxissomos, PTS (*Peroxisomal Targeting Signal*) foram identificados, o PTS1 e o PTS2. Como já mencionado anteriormente, as proteínas envolvidas na biogênese, divisão e hereditariedade dos peroxissomos são chamados peroxinas (codificadas pelos genes Pex). Como as proteínas formadas no citossol, a serem transportadas para os peroxissomos são reconhecidos? A marcação das proteínas a serem levadas para os peroxissomos, dependem de dois sinais marcadores peroxissomais (PTS1 e PTS2). A peroxina Pex 5p é o receptor para o PTS1 e o reconhecimento ocorre no citosol. O complexo Pex 5-proteína viaja até a membrana peroxissomal, onde interage com o complexo protéico de membrana, chamado importômero. Em seguida especula-se que um canal para a deslocação da proteína se forma, transitoriamente, diante da necessidade da organela [Erdman, Schliebs 2005]. Segundo esse modelo, conclui-se que se forma um poro que é montado e desmontado na membrana peroxissomal, sempre quando a importação de proteína ocorrer. Aceita-se que a natureza do poro é altamente dinâmica, considerando o grande intervalo do tamanho das proteínas importadas [Walton, Hill, Subramani 1995]. Portanto, o tamanho do poro que se forma, depende do tamanho da proteína. Segundo esse modelo, os receptores de importação, isto é, as peroxinas ligam as proteínas a serem transportadas e as direciona a um complexo de atracadouro na membrana peroxissomal. Aí, a proteína é liberada e transportada através da membrana, enquanto o receptor volta ao citossol. Logo, o receptor circula entre o citossol e o peroxissomo [Heiland, Erdman 2005]. Em conclusão, tanto as proteínas da matriz bem como, as proteínas das membranas dos peroxissomos são codificadas pelos genes do núcleo e traduzidas nos ribossomos livres do citosol [Lazarow, Fujiki 1985]. Essas proteínas são importadas com o auxílio de receptores (Pex 5p e Pex 7p) os quais circulam entre o citosol e os peroxissomos [Marzioch, Erdman et al., 1994].

Atribui-se aos peroxissomos a função de proteger componentes celulares sensíveis ao ataque

oxidativo do peróxido de hidrogênio.

BIBLIOGRAFIA GERAL

Devlin TM (editor). *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Seventh Edition. John Wiley & Sons, Inc. 2011

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (editores). *Biochemistry*. Fifth Edition. W. H. Freeman and Company, New York. 2002

Voet D, Voet JG (editores). *Biochemistry*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1995.

Zubay G (editor). *Biochemistry*. Addison-Wesley Publishing Company. Reading, Massachusetts. 1993

Nicolau J (editor). *Fundamentos de Bioquímica Oral*. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. 2009

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Barr FA, Short B 2003. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 15: 405-13.

Bennett MK, Calakos N, Scheller RH 1992. Syntaxin: a synaptic protein implicating in docking of synaptic vesicles at pre-synaptic active zone. *Science* 257: 255-9.

Block MR, Glick BS, Wilcox CA et al., 1988. Purification of an N-ethyl-maleimide sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Nat Acad Sci USA* 85: 7852-6.

Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV 2001. Coiled-coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11: 82-8.

Cang C, Zhou Y, Navarro B et al., 2015. mTor regulates lysosomal ATP sensitive two pore Na⁺ channels to adapt to metabolic state. *Cell* 152: 778- 90.

Cang C, Bekele B, Ren D 2014. The voltage gated sodium channel. Tpc1 c endolysosomal excitability. *Nat Chem Biol* 10: 463-9

Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y 2006. Cholesterol sensing, trafficking and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 127-57.

Chemomordik LV, Kozlov MM 2008. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15: 675-83.

Chen S, Melchior WB Jr, Guo L 2014. Endoplasmic reticulum stress in drug environmental toxicant induced liver toxicity. *J Environ Sci Health. Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 32: 83-104.

Clary DO, Griff IC, Rothman JE 1990. SNAPs, a family of NSF attachment proteins, involved

in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61: 707-21.

Cnop M, Foufelle F, Velloso LA 2012. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trend Mol Med* 18: 59-68.

Coffey JW, De Duve C 1968. Digestive activity of lysosomes I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J Biol Chem* 243: 3255-63.

Cohen FS, Melikyan GB 2004. The energetics of membrane fusion from binding through hemifusion, pore formation and pore enlargement. *J Memb Biol* 199: 1-14.

De Duve C, Baudhuin P 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46: 323-57.

Demongeot J, Glade N, Hansen O, Moreira A 2007. Na open issue: the inner mitochondrial membrane (IMM) as a free boundary problem. *Biochimie* 89: 1049-57.

Erdman R, Schliebs W 2005. Peroxisomal matrix import the transient pore model. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 738-42.

Ernster EL, Drahota Z 1969. Mitochondria structure and function. Symposium on mitochondria. *Fed Eur Biochem Soc Proceeding of the fifth meeting* 17: 5-31.

Fang Y, Morrell JC, Jones JM, Gould SJ. 2004. Pex 3 functions as Pex 19 docking factor in the import of class 1 peroxisomal membrane protein. *J Cell Biol* 164: 863-75.

Frey TG, Mannella CA 2000. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25: 319-24.

Fritzler MJ, Hamel JC, Ochs KL, Chan EKL 1993. Molecular characterization of two human autoantigens unique cDNA encoding 95 and 160 Kd proteins to a putative family in the Golgi complex. *J Exp Med* 178: 49-62.

Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L 2020. The biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Rev Mol Cell Biol* 21: 204-24.

Granger BL, Green SA, Gabel CA et al., 1990. Characterization and cloning of Igp 110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J Biol Chem* 265: 12036-43.

Hampton RY 2002. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 476- 82.

Hardie DG 2007. AMP activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 774-85.

Heiland I, Erdmann R 2005. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J* 272: 2362- 72.

Hua R, Kim PK 2016. Multiple paths to peroxisomes: mechanism of peroxisome maintenance in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1863: 881-91.

- Huber LA, Teis D 2016. lysosomal signaling in control of degradation pathways. *Curr Opin Cell Biol* 39: 8-14.
- Honsho M, Yamashita I, Fujiki Y 2016. Peroxisome homeostasis: mechanism of division and selective degradation of peroxisomes in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1863:984-91.
- Huotari J, Helenius A 2011. Endosome maturation. *EMBO J* 30: 3481-500.
- Ingber DE 2003. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Ann Med* 35: 564-77.
- Issemann I, Green S 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome lipid metabolism. *Biochimie* 79: 81-94.
- Jahn R, Cafiso DC, Tamm LK 2024. Mechanisms of SNARE proteins in membrane fusion. *Nature Rev Mol Cell Biol* 25: 101-18.
- Jahn R, Grubmuller H 2002. Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 14: 488-95.
- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ 2004. Pex19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane protein. *J Cell Biol* 164: 57-64.
- Jornayvaz FR, Shulmann GI 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47: 69-84.
- Kaufman RJ 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110: 1389-98.
- Kim PK, Hettema EH 2015. Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. *J Molec Biol* 427: 1176-90.
- Kim PK, Mullen RT, Schumann U, Lippincott-Schwartz J 2006. The origin and maintenance of peroxisomes involves a de novo Pex16 dependent pathway from the E.R. *J Cell Biol* 173: 521-32.
- Kim S, Kim MJ, Park DY, Chung HJ, Kim CH, Yoon JH, Kim HJ 2015. Mitochondrial reactive oxygen species modulate innate immune response to influenza A virus in human nasal epithelium. *Antivir Res* 119: 78- 83.
- Kolter T, Sandhoff K 2005. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator protein and anionic lysosomal lipid. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 81-103.
- Kovacs WJ, Olivier LM, Krisans SK 2002. Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog Lipid Res* 41: 369-91.
- Kovacs WJ, Krisans S 2003. Cholesterol biosynthesis and regulation: role of peroxisomes. *Adv Exp Med Biol* 544: 315-27.
- Kuo CY, Chin YC, Lee AY, Hwang TL 2015. Mitochondrial Lon protease controls ROS-dependent apoptosis in cardiomyocyte under hypoxia. *Mitochondrion* 23: 7-16.

- Lazarow PB, Fujiki Y 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1: 489-530.
- Li D, Li X, Guan Y, Guo X 2015. Metofusin-2-mediated tethering of mitochondria and endoplasmic reticulum promotes cell cycle arrest of vascular smooth muscle cells in G0/G1 phase. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 47: 441-50.
- Liesa M, Palacin M, Zorzano A 2009. Mitochondria dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89: 799-
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA 2007. Lysosomes fusion and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 622-32.
- Malhi H, Kaufman RJ 2011. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 54: 795-809.
- Malhotra JD, Kaufman RJ 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. A vicious cycle or a doubled edged sword? *Antiox Redox Sign* 9: 2277-93.
- Malhotra V, Orci B, Glick M et al., 1988. Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* 54: 221-7.
- Marzioch M, Erdmann R, Veenhuis M, Kunau WH 1994. PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS 2 containing protein into peroxisomes. *EMBO J* 13: 4908-18.
- Meinecke M, Bartsch P, Wagner R 2016. Peroxisomes protein import pores. *Biochim Biophys Acta* 1863: 821-7.
- Nozawa K, Fritzler M, Chan EKL 2005. Unique and shared features of Golgi complex autoantigens. *Autoimmu Rev* 4: 35-41.
- Nurse P 2003. Understanding cells. *Nature* 424: 883-
- Puigserver P, Wu Z, Park CW et al., 1998. A cold inducible coactivator of nuclear receptor linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829- 39.
- Radogna F, Albertini MC, DeNicola M et al., 2015. Melatonin promotes Bax sequestration to mitochondria reducing cell susceptibility to apoptosis via the lipoxygenase metabolite 5-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mitochondrion* 21: 113- 21.
- Rambold AS, Pearce EL 2018. Mitochondrial dynamics at the interface of immune cell metabolism and function. *Trends Immunol* 39: 6-18.
- Risselada HJ, Mayer A 2020. SNARE, tethers and SM proteins: how to overcome the final barriers to membrane fusion. *Bioche J* 477: 243-58.
- Rothman JE 2014. The principle of membrane fusion in the cell. *Angew Chem Int Edit* 53: 12676-94.

- Ruivo R, Anne C, Sagne C, Gasnier B 2009. Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1793: 636- 49.
- Saftig P, Klumperman J 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane protein trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 623- 35.
- Saftig P, Schroder B, Blanz J 2010. Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral condition. *Biochem Soc Trans* 38: 1420-3.
- Scarpulla RC 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576:1-14.
- Schrader M, Bonekamp NA, Islinger M 2012. Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 1822: 1343- 57.
- Schroder M, Kaufman RJ 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739- 89.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW et al., 1993. A protein assembly-diassembly pathway in vitro that may correspond to sequential step of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75: 409-18.
- Sudhof TC, Baumert M, Perin MS, Jahn R 1988. A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals and Drosophila. *Neuron* 2: 1475-81.
- Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J 2018. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* 62: 341-60.
- Ungar D, Hugos FM, 2003. SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 493- 517.
- Van den Bosch H, Schutgens RB, Wanders RJ, Tager JM 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* 61: 157- 97.
- Vogel F, Bornhodvd C, Neupert W, Reichert AS 2006. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175: 237-47.
- Wallace DC 2012. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 12: 685- 98.
- Walton PA, Hill PE, Subramani S 1995. Import of stably folded protein into peroxisome. *Mol Cell Biol* 6: 675- 83.
- Wanders RJA 2004. Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *Am J Med Genet A* 126A: 355-75.
- Wartosch L, Bright NA, Luzio JP 2015. Lysosomes. *Curr Biol* 25: R315-6.
- Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, Williams RS 2002. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296: 349- 52.

Yeung T, Georges PC, Flanagan LA et al., 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure and adhesion. *Cell Motil Cytoskel* 60:24-34.

Zhang X, Wang Y 2016. Glycosylation quality control by Golgi structure. *J Mol Biol* 428: 3183-93.

Zhang Y, Hughson FM 2021. Chaperoning SNARE folding and assembly. *Annu Rev Biochem* 90: 581-603.

CAPÍTULO 2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES

INTRODUÇÃO

A utilização de animais para pesquisa tem levantado muita controvérsia em vários países, mas principalmente na Inglaterra e Estados Unidos. Há os que são contrários e aqueles que são favoráveis ao uso de animais para pesquisa.

As pessoas contrárias ao uso de animais em pesquisa se fundamentam em dois tipos de argumentos: os que acreditam, que os animais têm direitos, e aqueles que acreditam nas consequências para os animais. Para os que se opõem, os animais têm uma posição (*standing*) moral, isto é, tem propriedades que os qualificam para proteção de moralidade [Beauchamp 1997]. Já os que são favoráveis ao uso de animais em pesquisa acreditam, que os animais não tem direitos e que no cálculo das consequências das pesquisas, deve-se levar em consideração os benefícios a longo prazo dos resultados alcançados, tanto para os humanos quanto para os próprios animais [Cohen 1986].

Os argumentos sobre pesquisa com animais estão polarizados, porque ambos os lados apresentam pensamentos completamente diferentes. Os oponentes da pesquisa com animais, estão mais preocupados com os direitos e o sofrimento dos animais, enquanto os que apóiam a pesquisa com animais, estão mais interessados na capacidade da pesquisa poder acelerar o desenvolvimento da geração do conhecimento da biologia, prevenção e terapia da doença [Smith 2001].

Um relatório apresentado pelo “*Nuffield Council on Bioethics*”, um órgão independente do Reino Unido, cuja comissão foi formada por membros com opiniões divergentes, procura clarificar o debate e ao mesmo tempo, procura ajudar as pessoas a identificar e analisar assuntos com relevância ética e científica. Assim, para essa comissão a utilização de animais em pesquisa apresenta um quadro mais complexo do que o simples debate contra ou pró a utilização; as pessoas divergem em suas opiniões sobre os tipos particulares de pesquisa, dependendo dos objetivos, tipos e localização da pesquisa, as espécies animais a serem usadas e o grau de sofrimento experimentado pelos animais nos diferentes contextos [Perry 2007]. Essa comissão, “*Nuffield Council on Bioethics*”, ainda sugeriu que o tratamento moral apropriado a um ser, depende muito mais das características que ele possui, do que a espécie a que ele pertence.

O debate ético apresenta discordância em dois pontos: (1) qual o limite absoluto? (2) como pesamos os fatores moralmente relevantes, que são diferentes dentro dos limites permitidos? Para fornecer respostas, a comissão considera cinco quesitos: (1) quais os objetivos da pesquisa? (2) quais as probabilidades de sucesso? (3) quais animais devem ser usados? (4) quais serão os efeitos sobre os animais que forem usados? (5) existe alguma alternativa? [Perry 2007].

A comissão concluiu, que progressos práticos nos métodos científicos, podem contribuir de forma considerável para reduzir a divergência sobre pesquisa envolvendo animais. Em razão disso, a utilização dos três R's (*replacement*, *reduction* e *refinement*) é de suma importância. *Replacement* (substituição) é considerado qualquer método científico, usando material não sensitivo, que substitua o uso de animais vertebrados vivos susceptíveis. *Reduction* (redução) é considerado um dos métodos que reduzem o número de animais necessários para se obter informações precisas sobre o assunto estudado. *Refinement* (refinamento) é considerado qualquer desenvolvimento, que leva a uma redução na incidência ou severidade dos procedimentos desumanos para aqueles animais em uso.

Para melhorar a aplicação dos 3 R's a comissão faz uma série de recomendações, dentre as quais podemos destacar: (a) uma análise completa das barreiras científicas para substituição (*replacement*) deve ser feita por um departamento governamental relevante; (b) as publicações científicas devem incluir informações de como os 3R's foram aplicados; (c) as agências financiadoras deveriam investir em projetos para encontrar soluções para a implementação dos 3 R's. [Perry 2007].

DIABETES: MODELOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A moléstia diabetes mellitus tornou-se conhecida como uma insuficiência ou falha pancreática, graças aos estudos de Minkowski na década de 1880 e de Banting e Best, na década de 1920, realizando pancreatectomia parcial ou total.

Os tipos de diabetes mais predominantes são classificados como diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2. São moléstias multifatoriais, onde o complexo genético interage com fatores ambientais, contribuindo para o desenvolvimento da doença [Ikegami, Fujisawa, Ogihara 2007].

Não há a menor dúvida de que a utilização de animais para o estudo dessa doença metabólica, constituiu-se numa importante etapa visando conhecer a base molecular, a patogênese das complicações e a utilidade de agentes terapêuticos [Chen, Wang 2005].

De acordo com o “*American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging*”, um modelo animal para pesquisa biomédica é aquele, em que um processo patológico espontâneo ou induzido pode ser investigado, onde os detalhes do processo se assemelham àqueles apresentados pelos seres humanos ou outras espécies animais [Chatzigeorgiou, Halapas et al., 2009].

Ainda, de acordo com esse comitê, os modelos animais de pesquisa em ciência da saúde, podem ser classificados em grupos: (a) modelo espontâneo, em que a doença ocorre espontaneamente nos animais; (b) modelo experimental induzido; (c) modelos geneticamente modificados, em que a doença ou condição sejam induzidos quimicamente, cirurgicamente ou por manipulação genética; (d) modelos negativos, incluindo animais resistentes a doenças ou condição particular.

Os primeiros estudos usando modelos animais nos remete a pancreatectomia de cães, usados para estudar o papel central exercido pelo pâncreas na homeostase da glicose, bem como para a descoberta e purificação da insulina [Lenzen, Panten 1988; Rees, Alcolado 2005].

Embora os cães tenham sido os primeiros animais usados para o estudo de diabetes, hoje a preferência recai para o uso de animais de porte menor, pois além de mais convenientes, a pesquisa fica mais barata [Radenkovic, Stajanovic, Prostan 2016]. Esta é a razão pelas quais a maioria das pesquisas usa roedores. Muito embora, os roedores sejam as espécies animais comumente mais usados, não são os ideais para pesquisa em diabetes, pois podem não refletir adequadamente vários mecanismos homeostáticos humanos [Rees, Alcolado 2005]. O uso de roedores permite ao pesquisador o estudo de várias gerações num curto período de tempo. Por exemplo, no rato o período de gestação é de 21 dias.

MODELOS ESPONTÂNEOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS TIPO 1

Os modelos animais mais empregados para se estudar o diabetes tipo 1 espontâneo, compreendem: o camundongo NOD (*non obese diabetics*), o rato BB (*Bio Breeding*), O rato LETL

(*Long Evans Tokushima Lean*), o rato KDP (*Komeda Diabetes Prone*) e o rato LEW-IDDM.

Camundongo NOD

O camundongo NOD, o mais utilizado para se estudar o diabetes tipo 1, apresenta uma insulite (forte infiltração leucocitária das ilhotas), que se inicia ao redor de 4-5 semanas e se desenvolve primeiramente com os linfócitos circundando o perímetro das ilhotas, continuando com uma infiltração linfocitária (principalmente células T). Após um período de destruição subclínica das células beta, instala-se o diabetes aberto [Chatzigeorgiou, Halapas et al., 2009].

A alta incidência do estado diabético nas colônias de camundongo NOD, ocorre nas fêmeas, alcançando 80-90 % na idade de 24 semanas, enquanto, a incidência nos machos fica por volta de 40%, na idade de 30 semanas em colonias livres de patógenos específicos [Makino, Kunimoto et al., 1980]. Posteriormente, foi relatado uma incidência de 85 % para fêmeas na 27a semana e 75% para machos na 40a semana de idade [Pomerleau, Bagley et al., 2005].

Neste ponto, poderíamos perguntar: como se originou o camundongo NOD, como modelo de diabetes tipo 1 espontâneo? O camundongo NOD foi desenvolvido por reprodução no laboratório de pesquisa Shionogi, no Japão [Makino, Kunimoto et al., 1980]. Segundo descrito por Atkinson e Leiter 1999 [Atkinson, Leiter 1999], o camundongo NOD surgiu no Japão, de uma linhagem de camundongos suíços, durante um experimento de cruzamento de camundongos irmãos, com a finalidade de produzir uma raça em que todos os animais apresentassem cataratas. Numa geração precoce de cruzamento, os camundongos não apresentaram cataratas, contudo apresentaram, em jejum, elevado teor de glicose no sangue (um sinal clínico de pré diabetes). Estes foram, então seletivamente procriados na esperança de se criar um modelo de camundongo para o desenvolvimento espontâneo de diabetes. O resultado final dessa seleção, foi uma raça NOD congênita, um modelo de diabetes tipo 2. A raça NOD, derivada a partir de uma linhagem de controle exibindo glicemia normal foi co-selecionada; o primeiro caso de diabetes autoimune tipo 1 espontâneo, ocorreu inesperadamente destes controles normoglicêmicos na vigésima geração de acasalamento de irmãos. Quando se procurou estudar a localização dos genes susceptíveis ao diabetes, a expressão, homozigoto do NOD alelos MHC (*Major Histocompatibility Complex*) é essencial para o desenvolvimento da moléstia, diferentemente da genética do diabetes tipo 1 humano em que o heterozigoto é comum. Quando a localização cromossômica de genes não MHC são identificados, é observado que a raça NOD ancestral contribui a parte da susceptibilidade genética. Contudo, alguma susceptibilidade é derivada do genoma da raça NOD.

Embora, os sintomas clínicos típicos do diabetes tipo 1, como hiperglicemia, glicosúria, polidipsia e poliúria, estejam presentes, o camundongo tem grande resistência ao desenvolvimento de cetoacidose e pode sobreviver por várias semanas sem tratamento com insulina, sendo a sua morte causado por desidratação [Mathews 2005].

Enquanto é aceito que o diabetes tipo 1 do camundongo NOD seja primariamente mediado por células T, o camundongo NOD também desenvolve autoanticorpos para insulina, detectável na sexta semana de idade, atingindo um pico entre 8 e 16 semanas de idade. Estes anticorpos não são os causadores diretos do diabetes, porém contribuem de forma significativa para a progressão da doença [Greeley, Katsumata 2002; Kagohashi, Udagawa et al., 2005].

Com a finalidade de determinar as regiões cromossômicas, que contém os genes capazes de modular a susceptibilidade ao diabetes tipo 1 no camundongo NOD, esta raça foi cruzada com outras resistentes à doença. O loci genético descoberto por este método foi designado IDD, para diabetes dependente de insulina, seguido por um número para descrever qualquer segmento

cromossomal, mostrando ligação evidente às características clínicas [Prochazka, Leiter et al., 1987].

Dessa forma, só para citar como exemplo, IDD1 é o principal contribuinte para o diabetes tipo 1 no camundongo NOD, diferentemente de outros IDD loci, sua presença é essencial para o desenvolvimento de insulite invasiva e diabetes aberto [Wicker, Todd, Peterson 1995; Prochazka, Serreze et al., 1989]. Outros loci foram relatados, cada um com as suas características. A moléstia diabetes no camundongo NOD apresenta muita similaridade com a disfunção pancreática humana [Roep 2003]. Uma diferença entre a doença no camundongo e em humanos relaciona-se ao fenótipo da insulite. No camundongo fêmea, a infiltração linfocitária é extensa, indicando o desenvolvimento de nódulo linfático ectópico, ao redor da vascularidade pancreática. Ao contrário, a insulite humana na maioria dos casos, parece ser mais suave, com poucos leucócitos detectáveis nas ilhotas inflamadas [Atkinson, Leiter 1999]. Outras diferenças observadas: os autoanticorpos específicos para antígenos das ilhotas, outros que não a insulina, estão quase completamente ausentes no camundongo NOD [Bonifacio, Atkinson et al., 2001]. Ainda, outras diferenças observadas: viés de gênero, no humano não tem, no camundongo o diabetes é relatado com predominância nas fêmeas; incidência em humanos 0,25 – 0,40% enquanto no camundongo a incidência é maior que 80%.

Entre as semelhanças do diabetes no camundongo NOD e dos humanos podemos destacar: predisposição genética; contribuição do loci MHC (*Major Histocompatibility Complex*); influência ambiental, além de outras semelhanças. [Roep, Atkinson, van Herrath 2004].

Camundongo NOD Humanizado: Os camundongos NOD humanizados podem ser categorizados em três grupos: 1) introduzir genes humanos nos camundongos NOD, com a finalidade de se estudar a função dos mesmos; 2) transplantar células humanas, para estudar células imunotransplantadas e 3) transplantar microbiota intestinal humana para estudar o efeito da microbiota intestinal humana no metabolismo ou imunidade do corpo. Além disso, o camundongo humanizado permite o teste e a identificação de novos terapêuticos [Person, Wong, Wen 2016].

Rato BB

O rato BB foi desenvolvido no Canadá, nos laboratórios *Bio Breeding*, por volta de 1970, daí o nome BB, a partir de uma colônia de ratos da raça Wistar [Nakhoda, Like et al., 1977]. Semelhantemente ao camundongo NOD, o rato BB desenvolve espontaneamente o diabetes auto imune, o qual também é caracterizado por autoanticorpos, pelas ilhotas beta, bem como, por anticorpos a descarboxilase do ácido glutâmico, GAD (*Glutamic Acid Decarboxylase*). Contrariamente ao camundongo NOD, a insulite apresenta muita semelhança com a insulite humana, começando 2-3 semanas antes do início da doença sem peri-insulite [Mathews 2005; Mordes, Bortell et al., 2004].

A hiperglicemia no rato BB começa com a idade de 8-16 semanas, e ao mesmo tempo aparece a insulopenia, a poliúria e a polifagia. Ao contrário do camundongo NOD, a cetoacidose é severa e letal, se não for tratada [Mathews 2005; Rees, Alcolado 2005]. Nos ratos BB diabéticos, observa-se a linfopenia das células T, bem como são deficientes em células T ART 2+. ART2 é uma enzima com atividade nicotinamida adenina dinucleotídeo glicohidrolase, que parece identificar células com propriedade imuno reguladores [Bortell, Kanaitzuka et al., 1999; Greiner, Rossini, Mordes 2001].

O aparecimento do diabetes autoimune no rato BB requer, pelo menos um gene associado ao MHC e especialmente uma classe II de alelo, chamado RT1/Du tipo haplo [Colle 1990].

Além da colônia desenvolvida no Canadá, outras colônias foram também estabelecidas. Assim, uma colônia desenvolvida em Worcester (Massachusetts), pelo acasalamento entre animais parentes e os animais espontaneamente diabéticos foram designados ratos Worcester diabetes-prone BB [Mordes, Bortell et al., 2004].

Foi descrito no rato BB um novo membro da família GTPase como IAN (*Immune Associated Nucleotide*) e sua mutação, que foi identificado no gene *gimap5* (RNO4) resulta em linfopenia das células T, causando diabetes neste modelo [MacMurray, Moralejo et al., 2002; Kruken, Schroetel et al., 2004]. A família GTPase é constituída de proteínas reguladoras que ligam e hidrolizam o GTP (Guanosina Tri Fosfato). Estas enzimas GTPases, apresentam importantes funções como iniciação, alongamento e término de síntese proteica; arranjo de microtúbulos; transdução de sinal; trânsito nas membranas, bem como regulador da proliferação celular.

Ambos os sexos dos ratos BB, o BBDP/Wor e o BBDP desenvolvem insulite pancreática que é rapidamente seguida de destruição seletiva das células beta e estado diabético entre 50-90 dias de idade [Al-Awar, Kupai et al., 2016].

Ratos LETL e KDP

O rato LETL (*Long Evans Tokushima Lean*) é outro modelo de animal diabético autoimune espontâneo, que não apresenta linfopenia, porém apresenta uma incidência da doença entre 15 e 20 % [Kawano, Hirashima et al., 1991]. Posteriormente, foi criada uma sub-raça o KDP (*Komeda Diabetes Prone*), que desenvolve a doença numa incidência de cerca de 70-80% em ambos os sexos (machos e fêmeas), também linfopênicos, apresentando severa insulite e exibindo infiltração linfocitária na tireóide e rins [Komeda, Noda et al., 1998; Mordes, Bortell et al., 2004].

Ratos LEW.1-AR-1-IDDM

Este modelo de ratos apresentando diabetes tipo 1 apareceu de forma espontânea numa colônia de ratos Lewis, caracterizados por MHC haplotipo definido (LEW.1AR1). Estes animais desenvolvem diabetes entre 60 e 90 dias de idade, sendo caracterizados por rápida progressão da insulite, promovendo a destruição das células beta [Lenzen, Tiedge et al., 2001; Jorns, Gunther et al., 2005]. Originalmente, a incidência de diabetes neste modelo animal era cerca de 20 %, contudo com posterior acasalamento de ratos parentes, a incidência subiu para cerca de 60 % de forma igual para ambos os sexos [Jorns, Gunther et al., 2005]. Antes dos animais apresentarem hiperglicemia, eles apresentam um período pré-diabético com infiltração das ilhotas. As células betas das ilhotas são infiltradas por linfócitos B e T, macrófagos e assassinos naturais (*natural killers-NK*) e a morte das células beta ocorre por apoptose [Mordes, Bortell et al., 2004], induzidas por citocinas pro-inflamatórias liberadas pelas células imune que infiltram as ilhotas [Jorns, Gunther et al., 2005].

Camundongo Akita

Desenvolvido em Akita, Japão, este modelo de diabetes tipo 1, se deve a uma mutação espontânea no gene *Ins2*, prevenindo, por conseguinte, o processamento correto da pré-pró-insulina, pro-insulina, insulina A pró-insulina, um precursor da insulina, das células beta das ilhotas pancreáticas, apresenta uma cadeia polipeptídica simples contendo 86 resíduos de aminoácidos. A pró-insulina produzida, deve ser transformada, no princípio biologicamente ativo,

a insulina, por clivagem proteolítica. Nesta clivagem, forma-se um fragmento de 35 resíduos de aminoácidos, o chamado peptídeo C e mais uma proteína formada por duas cadeias polipeptídicas, uma contendo 30 resíduos de aminoácidos e outra contendo 20 resíduos de aminoácidos ligados entre si por pontes dissulfeto, a insulina biologicamente ativa.

A mutação que ocorre no gene *Ins2* causa dobramento incorreto da proteína, lesão tóxica das células betas e reduzida secreção de insulina, que se inicia por volta de 3-4 semanas de idade, caracterizado por hiperglicemia, hipoinsulinemia, poliúria e polidipsia [Dhuria, Singh et al., 2015; Gurley, Mach et al., 2010].

MODELOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS TIPO II

Rato Zucker Obeso

Descoberto a partir de um simples gene recessivo autossomal no cromossomo, após cruzamento de ratos da raça Merck M com ratos da raça Sherman [King 2012]. Este tipo de rato é considerado um modelo de obesidade humana e diabetes tipo 2. A mutação que ocorre no receptor da leptina, induz a hiperfagia e como consequência o rato desenvolve obesidade, hiperlipidemia e hiperglicemia. A leptina é um hormônio protéico contendo 146 resíduos de aminoácidos, secretado pelos adipócitos e que atua sobre o receptor de membrana no hipotálamo, para gerar sinais de saciedade.

Resistência à insulina ocorre nos ratos jovens homozigotos, para receptores de leptina não funcional (Fa/Fa), seguido de defeito na secreção de insulina, o que provoca a hiperglicemia [Etgen, Oldham 2000]. A hiperglicemia se manifesta por volta de 7 semanas de idade e todos os ratos obesos são totalmente diabéticos por volta de 12 semanas de idade. Entre 7 e 10 semanas de idade, os níveis de insulina sérica são altos, porém começam a cair tão logo as células beta param de responder ao estímulo da glicose [Peterson, Néel et al., 1990].

Rato Goto Kakizaki

Este rato é um modelo diabético espontâneo, não obeso, aceito para o estudo de diferentes aspectos do diabetes tipo 2, uma vez que tem associações com as alterações tanto fisiológicas quanto patofisiológicas, que a moléstia produz [Buchwald, Menchaca et al., 2014; Portha, Giroix et al., 2012; Xue, Sukumaran et al., 2011]. Este modelo de animal diabético tipo 2 foi obtido a partir de ratos de uma colônia da raça Wistar, por cruzamento seletivo de animais apresentando intolerância moderada a glicose [Chen, Wang 2005]. O déficit da massa de células betas, que se observa nesses animais, é considerado o defeito primário, que causa hiperglicemia basal, detectada ao redor de 3 semanas de idade, contudo após 8 semanas de idade a glicemia piora e a resposta das células beta para a liberação de insulina estimulada pela glicose é severamente afetada [Suzuki, Aizawa et al., 1997].

Três fatores patogênicos parecem ser os responsáveis pela herança da massa defeituosa das células betas, a saber: (a) três loci independentes contendo genes responsáveis para a reduzida secreção de insulina; (b) metabólica gestacional hereditária reduzida, induzindo deficiência do pâncreas endócrino e (c) perda secundária (adquirida) da diferenciação das células beta devido a exposição prolongada a hiperglicemia (glicotoxicidade) [Portha 2003].

Quando submetido ao tratamento com peptídeo semelhante ao glucagon (*GLP-1 glucagon-*

like peptide), um hormônio dito incretina, os ratos Goto Kakizaki mostraram uma influência favorável a massa das células beta, resultando em neogênese, proliferação e controle da glicemia [Tourrel, Bailbe et al., 2002]. O termo incretina foi usado para indicar as substâncias hormonais derivadas do intestino e que atuam abaixando a glicemia [La Barre 1932]. Em outras palavras, hormônios incretínicos são fatores intestinais liberados por nutrientes orais, que estimulam a secreção de insulina numa concentração tipicamente pós-prandial alcançada na presença de hiperglicemia [Creutzfeldt 1979]. Dois peptídeos ditos incretínicos foram descritos: o peptídeo semelhante ao glucagon, GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose, GIP (*Glucose Dependent Insulinotropic Polypeptide*). O GLP-1 é um peptídeo de 37 resíduos de amino ácidos, codificado no gene do pró-glucagon, formados em tecidos específicos, num processo pós-tradução do pró-glucagon, por células L intestinais. É um potente estimulador da secreção de insulina (ação incretínica) sendo liberado na circulação em resposta a uma refeição [Nauck 1999]. Entre os efeitos deste peptídeo GLP-1, podemos citar: estimulação da secreção de insulina numa forma dependente de glicose; supressão de glucagon; redução do apetite e ingestão de alimento, desaceleração do esvaziamento, estimulação da neogênese das células beta [Nauck, Méier 2005].

Camundongo db/dB

Nesse camundongo o diabetes ocorre espontaneamente, devido a mutação recessiva autossomal no cromossomo 4, de animais deficientes do receptor de leptina [Coleman 1980]. Com o aumento da idade do animal, observa-se uma piora progressiva na resposta da insulina para a glicose. Outro aspecto, que também se observa é a maior sobrevivência dos camundongos fêmeas em relação aos machos e isso se deve, muito provavelmente a idéia que se tem de que o estrógeno tem um efeito protetor sobre as células beta do pâncreas [Chen, Wang 2005]. O estado hiperglicêmico, parece não ser um reflexo dos níveis de insulina plasmática, cujo pico ocorre por volta de 7 semanas de idade, mas sim estar relacionado a relação glucagon/insulina que se constitui num paralelo aproximado com o desenvolvimento da hiperglicemia. Isto quer dizer, que a hiperglicemia tem muito mais a ver com a relação glucagon/insulina, que ativa a neoglicogênese hepática, do que com os simples níveis de insulina [Kodama, Fujita et al., 1994].

Resumindo, nós temos o seguinte quadro:

Quadro 2.1 - Modelos de Animais Diabéticos Espontâneos Genéticos

Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2
Camundongo NOD	Rato Zucker Obeso
Rato BB	Rato Goto Kakizaki
Rato LEW.1AR1-iddm	Camundongo dB/dB
Camundongo Akita	

MODELOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS INDUZIDOS QUIMICAMENTE

Como já foi visto anteriormente, muito do conhecimento sobre o grupo da moléstia conhecida como diabetes, foi gerado usando principalmente roedores (ratos e camundongos). O uso desses animais de pequeno porte, permite ao pesquisador estudar várias gerações num curto período

de tempo.

Dois agentes diabetogênicos são comumente utilizados para a indução química do diabetes, a saber, a aloxana e a estreptozotocina, administradas por via parenteral (intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea). A dose usada para indução do diabetes depende da espécie animal, via de administração ou estado nutricional do animal [Federiuk, Casey et al., 2004].

A literatura nos mostra, que tanto a aloxana, quanto a estreptozotocina são os agentes diabetogênicos mais empregados para a pesquisa sobre diabetes, contudo outros agentes químicos, embora pouco estudados, também, apresentam ação diabetogênica. Entre eles podemos citar o vacor, também chamado pirimil, um rodenticida [Ann, Lee, Lee 1998], ditizone [Halim, Khalifa et al., 1977], aurotioglicose [De Leeuw, Van Rooy]. As informações sobre esses compostos são escassas. Assim, por exemplo, o vacor é um rodenticida. Quando administrado a ratos, provoca o espessamento da membrana basal glomerular, devido ao aumento do colágeno tipo IV, laminina e mucopolissacarídeos neutros [Seon, Lee, Lee 1999].

Duas hipóteses foram levantadas para a ação diabetogênica do vacor: aumento da resistência a ação da insulina [Lee, Lee 1977] e redução da secreção de insulina [Proser, Karam 1978; Taniguchi, Yamashiro et al., 1989]. A aurotioglicose é um composto que atua no centro do apetite no hipotálamo e induz significativa hiperfagia e obesidade em camundongos, sendo utilizado para estudar obesidade e diabetes tipo 2. Camundongos obesos induzidos por aurotioglicose, mostram reduzido teor de insulina nas ilhotas pancreáticas, o que vem a favor da idéia de que camundongos diabéticos apresentam um defeito de função das células beta [Karasawa, Takaishi, Kumagai 2011]. Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a ação da aurotioglicose: o estresse do retículo endoplasmático, induzido por excesso de demanda para a biossíntese de insulina no retículo endoplasmático, poderia causar a disfunção das células beta [Harding, Ron 2002]; outra hipótese para explicar a disfunção das células beta, seria o defeito na sensibilidade a glucose ou sinalização intracelular, que precede a secreção de insulina [Del-Guerra, Lupi et al., 2005; Henquin 2000]. Após lesão no núcleo ventromedial do hipotálamo, induzido por lesão química, os camundongos mostram resistência a leptina, hiperfagia, hiperinsulinemia e obesidade [Huypens, Quartier 2006]. Vamos lembrar, que leptina é um hormônio secretado por adipócitos na proporção direta da massa adiposa. Atua através de um receptor de membrana no hipotálamo para gerar sinais de saciedade. A síndrome da obesidade resulta da resistência hipotalâmica a leptina, uma vez que o tratamento com aurotioglicose, provoca redução nos níveis da expressão hipotalâmica de receptores de leptina [Fei, Okano et al., 1997], e uma perda paralela da ação da leptina [Satoh, Ogawa et al., 1997].

Em camundongos obesos, tratados com aurotioglicose, a hiperinsulinemia precede o aumento da expressão do gene *ob* e hiperleptinemia, o qual está fortemente associado com a adiposidade [Bryson, Phuyal et al., 1999].

ALOXANA

A aloxana [(2,4,5,6) tetra oxo hexahidropirimidina] é preparada por oxidação direta do ácido úrico. Apresenta-se sob a forma cristalina, torna-se de cor rosa a temperatura de 230 oC e se decompõe a 256oC. A aloxana é solúvel em água e a solução quando em contato com a pele, desenvolve nesta uma cor vermelha [The Merck Index, 11th Ed Merck & Co, New Jersey, USA 1989].

Estudando o ácido úrico, Wohler e Liebig, publicaram em 1938 [Lenzen, Panten 1988], uma série de compostos sintetizados a partir desse ácido, tais como aloxana, uramil, ácido dialúrico e

aloxantina. Todos derivados da pirimidina. A ação diabetogênica da aloxana foi descrita em 1943 por Dunn, Sheehan e McLetchie [Dunn, Sheehan, McLetchie 1943; Lenzen, Panten 1988]. A aloxana é um ácido fraco, hidrofílico, quimicamente instável em soluções tamponadas, com uma meia vida de 1 minuto e meio a 37°C e pH 7,40 [Lenzen 2008]. Na indução do estado diabético pela aloxana, numa primeira etapa ocorre uma hipoglicemia, que é transitória. Essa curta resposta hipoglicêmica, resulta de uma estimulação transitória da secreção de insulina, fato que pode ser observado pelo aumento da concentração de insulina plasmática.

Esse estado se deve, temporariamente ao menor consumo e maior disponibilidade da adenosina trifosfato (ATP) devido a inibição da enzima glicoquinase [Lenzen S 2008]. A glicoquinase, também conhecida como hexoquinase IV, é uma das isoenzimas que fosforila a glicose convertendo-a a glicose-6-fosfato. É encontrada principalmente no fígado, porém também está presente nas células beta do pâncreas. No pâncreas é encontrada nas ilhotas, porém não no pâncreas exócrino. As hexoquinases I, II e III encontradas na maioria dos tecidos tem uma constante de Michaelis-Menten (K_m) baixo, o que significa que apresentam alta afinidade pela glicose, no entanto são fortemente inibidas pelo produto formado a glicose-6-fosfato. Já a glicoquinase (hexoquinase IV) apresenta alto K_m , isto é, baixa afinidade pela glicose, por outro lado é menos sensível a inibição pelo produto da reação. A constante de Michaelis-Menten consiste em um número de constantes de velocidade e seu valor é usado para indicar quão bem o substrato interage com a enzima. Quanto mais baixo o valor do K_m maior a afinidade entre a enzima e o substrato. Por outro lado, quanto maior o valor do K_m , menor a afinidade entre enzima e substrato. No caso das hexoquinases, as isoenzimas I, II e III apresentam valor de K_m mais baixo que a isoenzima IV (glicoquinase), portanto apresentam maior afinidade para com a glicose.

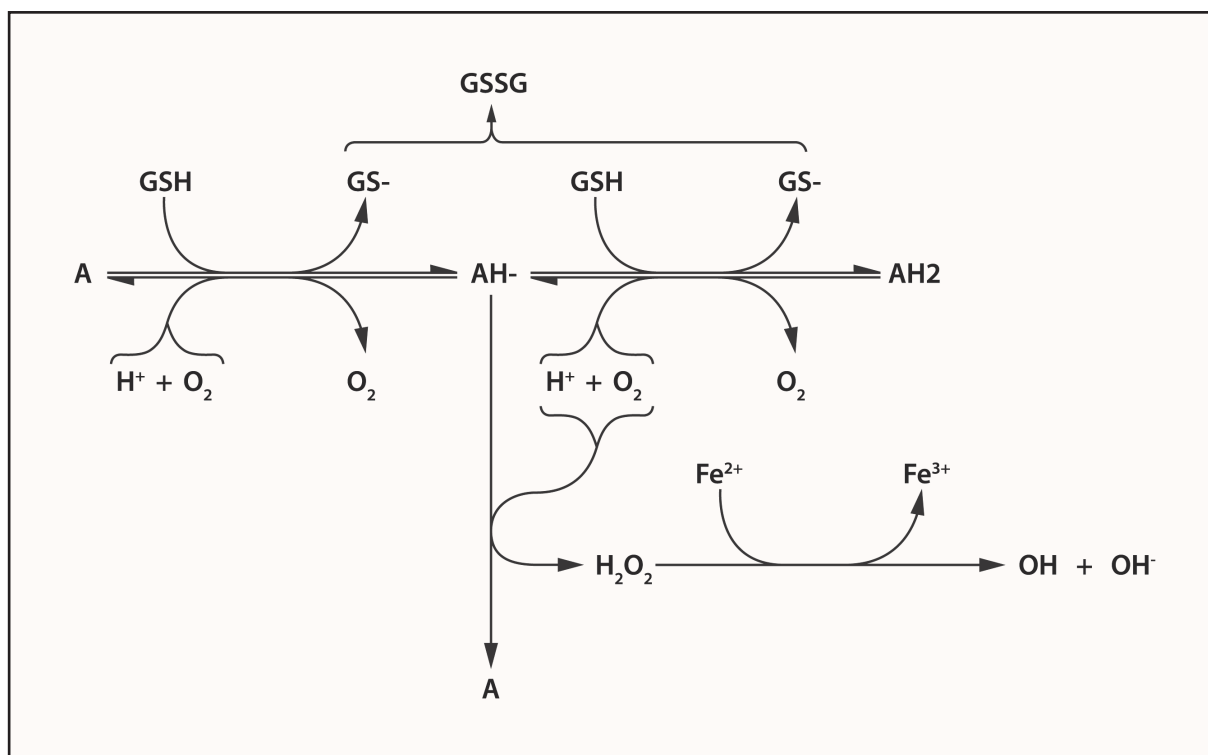
Nas células beta do pâncreas, a glicoquinase parece funcionar como uma enzima de reconhecimento de sinalização, que acopla alterações na concentração de glicose sanguínea com alterações na taxa de secreção de insulina [Lenzen, Panten 1988; Meglasson, Matschinsky 1984]. A inibição da atividade da glicoquinase por oxidação de dois grupos sulfidrilas (-SH) existentes no centro ativo da enzima pode ser uma das explicações para a ação diabetogênica da aloxana [Lenzen, Panten 1988]. A inibição da glicoquinase causa uma redução na reação de fosforilação da glicose pela enzima e como consequência menos substrato para o metabolismo da glicose ocorrer. Com a diminuição da utilização da glicose (devido a inibição da glicoquinase), esta se acumula e como consequência a hiperglicemia fica visível. A hiperglicemia perdurando por um período muito prolongado, torna-se tóxica para as células beta (fenômeno conhecido com glicotoxicidade). Dessa forma, as células betas reduzem a secreção de insulina, reduzem os grânulos de insulina, bem como o número de células beta [Weir, Aguayo-Mazzucato, Boné-Weir 2013; Jonas, Sharma et al., 1999]. Neste ponto podemos abordar o que realmente ocorre quando o animal é injetado com aloxana, descrito da seguinte forma [Lenzen 2008]:

Os eventos podem ser classificados em quatro etapas: (1) Na primeira fase, tão logo o animal é injetado (mais ou menos 30 minutos), observa-se uma hipoglicemia transitória. Esta hipoglicemia transitória se deve a inibição da enzima glicoquinase reduzindo, por conseguinte o consumo de ATP. O aumento da disponibilidade do ATP, na célula bloqueia o canal KATP (canal sensível ao ATP) e isso provoca secreção de insulina; (2) A segunda fase é caracterizada por uma hiperglicemia, com duração de até 3 horas, onde se observa inibição da secreção de insulina; (3) A terceira fase é caracterizada por uma hipoglicemia, cujo pico ocorre por volta das 6 horas após a injeção de aloxana. Esta hipoglicemia, também transitória se deve a um fluxo de insulina na circulação, resultante da toxidez dos grânulos de secreção de insulina e ruptura da membrana celular das células beta e (4) Finalmente, após 72 horas da injeção de aloxana, estabelece-se a hiperglicemia permanente, com perda da integridade das células beta.

A pergunta que nos vem a mente é: qual o mecanismo de ação da aloxana como agente diabetogênico? A resposta a esse questionamento está na dualidade de atuação desse agente: (a) a aloxana inibe a secreção de insulina induzida pela glicose, ao inibir especificamente a glicoquinase, o sensor da glicose das células beta e (b) a aloxana causa a diabetes dependente de insulina, ao possibilitar a formação de espécies reativas de oxigênio, com necrose celular [Lenzen 2008]. Para que a aloxana possa atuar, primeiro ela tem que entrar na célula. Em virtude da semelhança estrutural entre a aloxana e a glicose, o transportador de glicose das células beta, o GLUT 2, aceita a aloxana colocando-a dentro da célula, no citossol. Uma vez dentro da célula, a aloxana inibe a enzima glicoquinase, bloqueando os grupos sulfidrilas do centro ativo da enzima. Na presença de substâncias contendo grupos sulfidrilas, como por exemplo a glutathiona e a cisteína, a glicoquinase pode ser protegida dessa inibição, pois esses agentes redutores reduzem a aloxana ao ácido dialúrico, este não é um reagente de grupos sulfidrilas [Lenzen, Munday 1991; Lenzen, Freytag, Panten 1988].

Geralmente é aceito que a toxicidade da aloxana é mediada pelas espécies reativas de oxigênio, gerados pelo seu potencial ciclo redox [Oberly 1988]. As espécies reativas de oxigênio, podem lesionar todas as classes de macromoléculas e por fim pode levar a célula à morte, estando implicados num número de moléstias humanas. A redução da aloxana para ácido dialúrico pode ser realizada pelo tripeptídeo glutathiona, que como já vimos tem um grupo sulfidrilas que é redutor. O ácido dialúrico formado sofre uma auto-oxidação subsequente, estabelecendo assim um ciclo redox, com produção principalmente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e glutathiona oxidado (GSSG). O ciclo redox ocorre da seguinte maneira de acordo com os relatos da literatura [Winterbourn, Munday 1989; Lenzen 2008] (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Formação de espécies reativas de oxigênio durante o ciclo redox da aloxana. A = aloxana, AH = Radical aloxana; AH2 = Ácido dialúrico; GSH = glutathiona reduzida; GSSG = glutathiona oxidada; Fe^{2+} = Ferro reduzido; Fe^{3+} = Ferro oxidado; H_2O_2 = Peróxido de hidrogênio; OH = Radical hidroxila; OH^- = Grupo hidroxila; H^+ = proton



A redução da aloxana para ácido dialúrico na célula requer a presença de grupos SH. A auto-oxidação do ácido dialúrico produz radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pela reação de Fenton produz radicais hidroxila OH^-

A reação de Fenton se processa entre o peróxido de hidrogênio e um metal catalisador, neste caso o ferro



O radical hidroxila é o que apresenta a maior toxicidade para a célula.

A homocisteína é um amino ácido que contém um grupo sulfidril, que quando se acumula no organismo provoca alguns efeitos patológicos, estando envolvida na síndrome metabólica e obesos diabéticos [Sanchez-Margalat, Valle et al., 2002]. Apresentando um grupo sulfidril a homocisteína reduz a aloxana a ácido dialúrico, formando o ciclo redox com produção de espécies reativas de oxigênio que favorece a toxicidade da homocisteína [Scullion, Gurgul-Convey et al., 2012]. A glicose pode fornecer uma completa proteção contra os efeitos tóxicos da aloxana [Lenzen, Panten 1988]. É fácil de entender essa proteção, sendo o substrato natural da glicoquinase, a glicose ocupa o centro ativo da enzima, onde os grupos sulfidrilas se encontram, preservando desta forma o mecanismo de defesa antioxidante das células beta. O resultado dessa proteção é que não se forma o ciclo redox, nem as espécies reativas de oxigênio e peróxido de hidrogênio, responsáveis pela fragmentação do DNA das células beta [Takasu, Komiya et al., 1991].

ESTREPTOZOTOCINA

A estreptozotocina é um derivado da glicose, isolada por fermentação do *Streptomyces Achromogenes*. É solúvel em água, pouco solúvel em álcool e acetona. Em solução aquosa rapidamente sofre mutarrotação, para atingir um equilíbrio entre os anômeros alfa e beta. Quimicamente é o 2-deoxi-2-(3'-metil-3'-nitrosoureido) D glicopiranosose. A LD50 em camundongos é de 360 mg/kg de peso corporal administrado via intraperitoneal. Se administrado por via intravenosa a LD50 é de 275 mg/kg de peso corporal [Índex Merck 2008].

Uma vez estabelecida sua estrutura por estudos de degradação [Herr, Jahnke, Argoudelis 1967], foi possível a síntese química da estreptozotocina [Hesler, Jahnke 1970]. A estreptozotocina obtida por síntese química apresenta os mesmos efeitos daquela obtida por fermentação do *Streptomyces Achromogenes*, isto é, administrado a ratos produz, inicialmente hiperglicemia seguido de hipoglicemia, para finalmente a hiperglicemia persistente, bem como perda de peso corporal [Karunanayake, Hearse, Mellows 1974]. Pela síntese química foi possível obter uma estreptozotocina com marcação específica com (^{14}C) carbono radioativo e com isso se estudasse sua distribuição no organismo animal. Dessa maneira, foi observado que grande parte da estreptozotocina estava associada ao fígado e rins, atingindo um pico até 30 minutos após a administração, para então declinar progressivamente até uma concentração mínima após 6 horas [Karunanayake, Hearse, Mellows 1974], bem como também, foi detectado radioatividade no pâncreas. Para que a estreptozotocina possa exercer sua atividade tóxica, primeiro ela tem

que entrar na célula beta. Sendo um derivado da glicose, o transportador deste carboidrato, que apresenta baixa afinidade, o GLUT 2, se encarrega de colocar a estreptozotocina no interior da célula [Tjalve, Wilande, Johansson 1976; Karunanayake, Baker et al., 1976]. A importância do transportador GLUT-2, no processo de colocar a estreptozotocina dentro da célula, pode ser verificada naqueles tecidos que expressam esse transportador, como é o caso do fígado e rins [Rerup 1970; Weiss 1982]. Como podemos concluir que o GLUT-2 é o responsável por colocar a estreptozotocina dentro das células? O envolvimento desse transportador na interiorização da estreptozotocina dentro da célula tem por base o fato, que células que não expressam esse transportador (GLUT-2) são resistentes a toxicidade da estreptozotocina [Ledoux, Wilson 1984] e tornam sensíveis somente após a expressão do GLUT-2 nessas células [Schnedl, Ferber et al., 1994].

A dose ótima da estreptozotocina para produzir o estado diabético varia com a espécie animal. Assim, para ratos a dose com uma única injeção intraperitoneal varia de 40 a 60 mg/kg de peso corporal, enquanto para o camundongo varia de 175 a 200 mg/kg de peso corporal e cães de 15 mg/kg de peso corporal [Ganda, Rossi, Like 1976; Kennedy, Zochodne 2000; Sharma, Jaya et al., 2010]. Enquanto para ratos, apenas uma única injeção intraperitoneal é suficiente para iniciar o estado diabético, para camundongos são necessárias três injeções consecutivas, ministradas no animal em jejum (de mais ou menos 15 horas). As doses recomendadas para injeção intraperitoneal no camundongo são: no primeiro dia 85 mg/kg de peso corporal; no segundo dia 70 mg/kg de peso corporal e no terceiro dia 55 mg/kg de peso corporal [Maxfield, Cotter, Cameron 1995; Sharma, Jaya et al., 2010]. A estreptozotocina atua através de dois mecanismos de ação: 1. metilação (alquilação) do DNA e 2. geração de espécies reativas de oxigênio. Uma vez dentro da célula beta, a estreptozotocina libera o óxido nítrico (NO) que inibe a aconitase e participa na metilação do DNA [Thomas, Ramwell 1989]. Por sua vez, a metilação (alquilação) do DNA induz a ativação da ribolização do poli-ADP, levando a depleção do NAD e ATP. Experimentos mostram que a causa principal da morte das células betas é a metilação do DNA [Delaney, Dunger et al., 1995].

O óxido nítrico (NO) liberado da estreptozotocina inibe a enzima aconitase. Esta enzima é mitocondrial e catalisa a reação entre o citrato e o isocitrato. Ao inibir a aconitase a estreptozotocina interfere no ciclo de Krebs onde ocorre a síntese de ATP, havendo consequentemente redução da concentração desse nucleotídeo dentro da mitocôndria. Ao mesmo tempo aumenta a atividade da enzima xantino oxidase (xantino oxidoreductase). Qual o papel dessa enzima? Ela catalisa a oxidação da hipoxantina e xantina para ácido úrico. Nessa transformação formam-se as espécies reativas de oxigênio [SZkudelski 2001]. A hipoxantina é o produto do metabolismo de nucleotídeos adenínicos e a xantina o produto do metabolismo de nucleotídeos guanínicos. A xantino desidrogenase (redutase) requer para sua ação o NAD como aceptor de elétrons, enquanto a xantino oxidase utiliza o oxigênio molecular com geração de peróxido de hidrogênio e posteriormente radicais superóxido e hidroxila. Com isso a concentração do NAD⁺ é reduzido e como consequência, ocorre a inibição da síntese e secreção de insulina [Uchigata, Yamamoto et al., 1982; Strandell, Eizirik et al., 1988].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szucs G et al., 2016. Experimental diabetes mellitus in different animal models. *J Diabetes Res* article ID 9051426 ; doi 10.1155/ 2016/ 9051426.

Anderson MS, Bluestone JA 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23: 447-85.

Ann JS, Lee TH, Lee MC 1998. Ultrastructure of neuromuscular function in vacor induced diabetes. *Korean J Intern Med* 13: 47-50.

Atkinson MA, Leiter EH 1999. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nature Med* 5: 601-4.

Beauchamp TL 1997. Opposing views on animal experimentation: Do animals have rights. *Ethics & Behavior* 7: 113-21.

Bonifacio E, Atkinson M, Eisenberth G et al., 2001. International workshop on lessons from animal models for human type 1 diabetes. Identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral immunity in obese diabetic mice. *Diabetes* 50: 2451-8.

Bortell R, Kanatsuka T, Stevens LA et al., 1999. The RT6 (ART2) family of ADP ribosyl transferases in the rat and mouse. *Mol Cell Biochem* 193: 61-8.

Bryson JM, Phuyal JL, Proctor DR et al., 1999. Plasma insulin rise precedes rise in ob mRNA expression and plasma leptin in gold thioglucose obese mice. *Am J Physiol* 276: E 358-64.

Buchwald H, Menchaca HJ, Michalek VN, Bertin NT 2014. Ileal effect on blood glucose HbA1C and GLP-1 in Goto-Kakizaki rats. *Obes Surgery* 24: 1954-60.

Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatis K, Kamper E 2009. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In vivo* 23: 245- 58.

Chen D, Wang MW 2005. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 7: 307- 17.

Cohen C 1986. The case for the use of animals in biomedical research. *New Engl J Med* 315: 865-70.

Coleman DL, 1980. Lessons from studies with genetic forms of diabetes in the mouse. *Metabolism* 32: 162- 4.

Colle E 1990. Genetic susceptibility to the development of spontaneous insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 1-9.

Creutzfeldt W 1979. The incretin concept today. *Diabetologia* 16: 75-85.

De Leeuw I, Van Rooy P, Dhollander M 1981. Bone mass in obese gold thioglucose treated hyperglycemic mice. *Diabetologia* 20: 147- 57.

Del Guerra S, Lupi R, Marselli L et al., 2005. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 727- 35.

Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M et al., 1995. Comparison of inhibition of glucose stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and ethyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol* 50: 2015-20.

Dhuria RS, Singh G, Kaur A, Kaur R, Kaur T 2015. Current status and patent prospective of animal models in diabetic research. *Adv Biomed Res* 4; 117-doi 10.4103/2277-9175.157847.

Dunn JS, Sheehan HL, McLetchie NGB 1943. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* 1: 484-7.

Etgen GJ, Oldham BA 2000. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism* 49: 684-8.

Fadeau B, larger E, Lepault F, Carel JC, Boitard C 2005. Role of β cells in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes* 54: S 87- S 96.

Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK 2004. Introduction of type 1 diabetes mellitus in laboratory rat by use of alloxan: rout of administration pitfalls and insulin treatment. *Comp Med* 54: 252-7.

Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH et al., 1997. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptor (ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 94: 7001-5.

Ganda OP, Rossi AA, Like AA 1976. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetologia* 25: 595-603.

Greeley SA, Katsumata M, Yu L et al., 2002. Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevent diabetes in non obese diabetic mice. *Nature Med* 8: 399-402.

Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP 2001. Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: caveat emptor and primum non nocere. *Clin Immunol* 100: 134-43.

Gurley SB, Mach CL, Stegbauer J et al., 2010. Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in Ins 2⁺/c96y (Akita) mice. *Am J Physiol* 298: F 788- F 795.

Halim D, Khalifa K, Awadallah R, El-Hawary Z, El-Dessouky EA 1977. Serum mineral changes in dithizone induced diabetes before and after insulin treatment. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft* 16: 22-6.

Harding HP, Ron D 2002. Endoplasmic reticulum stress and development of diabetes: a review. *Diabetes* 51 (suppl 3): S 455- S 461.

Henquin JC 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-60.

Herr RR, Jahnke HK, Argoudelis AD 1967. The structure of streptozotocin. *J Am Chem Soc* 89: 4808-9.

Hessler EJ, Jahnke HE 1970. Improved synthesis of streptozotocin. *J Org Chem* 35: 245-6.

Heydrick SJ, Gautier N, Olichon-Berthe C et al., 1995. Early alteration of insulin stimulation of PI-3 kinase in muscle and adipocyte from gold thioglucose obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268: E 604- 12.

- Huypens P, Wuartier E 2006. Adiponectin expression in paradoxically increased in gold thioglucose induced obesity. *Horm Metab Res* 38: 486-90.
- Ikegami H, Fujisawa T, Ogiwara T 2004. Mouse models of type 1 and type 2 diabetes derived from the same closed colony: Genetic susceptibility shared between two types of diabetes. *ILAR J* 45: 268-77.
- Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W et al., 1999. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274: 14112-21.
- Jorns A, Gunther A, Hedrich HJ et al., 2005. Immune cell infiltration, cytokine expression and beta cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic Lew.1AR 1/ztm-iddm rat. *Diabetes* 54: 2041-52.
- Kagohashi Y, Udagawa J, Abiru N, Kobayashi M, Moriyama K, Otani H 2005. Maternal factors in the model of type 1 diabetes differentially affect the development of insulinitis and overt diabetes in offspring. *Diabetes* 54: 2026-31.
- Karasawa H, Takaishi K, Kumagai Y 2011. Obesity induced diabetes in mouse strain treated with gold thioglucose: a novel animal model for studying beta cell dysfunction. *Obesity* 19: 514- 21.
- Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G 1974. The synthesis of [¹⁴C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J* 142: 673-83.
- Karunanayake EB, Baker JR, Christian RA, et al., 1976. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (¹⁴C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia* 12: 123-8.
- Kawano K, Hirashima T, Mori S et al., 1991 New inbred strain of Long Evans Tokushima Lean rats with IDDM without lymphopenia. *Diabetes* 40: 1375-81.
- Kennedy JM, Zochodne DW 2000. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing possible mechanism. *Brain* 123: 2118-29.
- Kim JM, Lee TH, Lee MC et al., 2002. Endoneurial microangiopathy of sural nerve in experimental vacor induced diabetes. *Ultrastructural Pathol* 26: 393- 401.
- King AJ 2012. The use of animal model in diabetic research. *Br J Pharmacol* 166: 877-94.
- Kodama H, Fujita M, Yamazaki M, Yamaguchi I 1994. The possible role of age related increase in the plasma glucagon/insulin ratio in enhanced hepatic gluconeogenesis and hyperglycemia in genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice. *Jpn J. Pharmacol* 66: 281-7.
- Komeda K, Noda M, Terao K et al., 1998. Establishment of two substrains, diabetic prone and non diabetic from Long Evans Tokushima Lean (LETL) rats. *Endocr J* 45: 737-44.
- Kruken J, Schroel RMU, Muller IO et al., 2004. Comparative analysis of the human gimap gene cluster encoding a novel GTPase family. *Gene* 34: 291-304.
- La Barre J 1932. Sur les possibilités d'un traitement du diabète par l'incrétine. *Bull Acad R*

Med Belg 12: 620-34.

Ledoux SP, Wilon GL 1984. Effects of streptozotin on a clonal isolate of rat insulinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 804: 387-92.

Lee TH, Lee MW 1977. Inhibitory effect of rodenticide RH-787 on the glucose metabolism of erythrocytes. *Korean J Intern Med* 20: 597.

Lenzen S, Panten U 1988. Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* 31: 337-42.

Lenzen S, Panten U 1988. Signal recognition by pancreatic beta cells. *Biochem Pharmacol* 37: 371-8.

Lenzen S, Freytag S, Panten U 1988. Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with –SH groups in the sugar binding site of the enzyme. *Mol Pharmacol* 34: 395-400.

Lenzen S, Munday R 1991. Thiol group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* 42: 1385-91.

Lenzen S, Tiedge M, Elsner M et al., 2001. The LEW.1AR1/ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin dependent diabetes. *Diabetologia*. 44: 1189-96.

Lenzen S 2008. The mechanism of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia* 51: 216-26.

MacMurray AJ, Moralejo DH, Kwitek AE et al., 2002. Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to mutation in a novel immune-associated nucleotide (IAN) related gene. *Genome Res* 12: 1029-39.

Meglasson MD, Matschinsky FM 1984. New perspective on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol* 246: E 1- E 13.

Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y 1980. Breeding of a non obese diabetic strain of mice. *Exper Anim* 29: 1-8.

Mathews CE 2005. Utility of murine models for the study of spontaneous autoimmune type 1 diabetes. *Pediatr Diabet* 6: 165-77.

Maxfield EK, Cotter LA, Cameron NE 1995. Nerve function and regeneration in diabetes rats: effects of 2-D-7155 and receptor antagonist. *Am J Physiol* 269: E 530-7.

Meglasson MD, Matschinsky FM 1984. New perspective on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol* 246: E 1- E 13.

Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP et al., 2004. Rat models of type 1 diabetes: genetic environment and autoimmunity. *ILAR J* 45: 278-91.

Morrison JF, Sheen R, Dhanasekaran S et al., 2008. Sensory and autonomic nerve changes in monosodium glutamate treated rat. A model of type2 diabetes. *Exp Physiol* 93: 213-22.

- Nakhooda AF, Like AA, Chappel CL, Murray FT, Marliss EB 1977. The spontaneously diabetic wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes* 26: 100-2.
- Nauck MA 1999. Is glucagon like peptide 1 an incretin hormone? *Diabetologia* 42: 373-9.
- Nauck MA, Meier JJ 2005. Glucagon like peptide 1 and its derivatives in the treatment of diabetes. *Reg Peptides* 128: 135- 48.
- Oberly LW 1988. Free radicals and diabetes. *Free Rad Biol Med* 5: 113-24.
- Person JA, Wong FS, Wen L 2016. The importance of the non obese diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 66: 76-88.
- Perry P 2007. The ethic of animal research: a UK perspective. *ILAR J* 48: 42-6.
- Peterson RG, Neel MA, Little LA, et al., 1990. Zucker diabetic fatty as model for noninsulin dependent diabetes mellitus. *ILAR News* 32: 16-9.
- Pomerleau DP, Bagley RJ, Serreze DV et al., 2005. Major histocompatibility complex-linked diabetes susceptibility in NOD/Lt mice: subcongenic analysis localizes a component of Idd16 at the H2-D end of diabetogenic H2(g7) complex. *Diabetes* 54: 1603-6.
- Portha B 2003. Transmitted beta cell dysfunction as a cause for type 2 diabetes. *Med Sci (Paris)* 19: 847-53.
- Portha B, Giroix MH, Tourrel CC Le-Stunff H, Movassat J 2012. The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. *Meth Mol Biol* 933: 125-59.
- Prochazka M, Serreze DV, Worthen SM, Leiter EH 1989. Genetic control of diabetogenesis in NOD/Lt mice: development and analysis of congenic stocks. *Diabetes* 38: 1446-55.
- Prochazka M, Leiter EH, Serreze DV, Coleman DL. 1987. Three successive loci required for insulin dependent in NOD mice. *Science* 237: 286-9.
- Proser PR, Karam JH 1978. Diabetes mellitus following rodenticide ingestion in man. *J Am Med Ass* 239: 1148-50.
- Radenkovic M, Stajanovic M, Podstan M 2016. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin. The current state of art. *J Pharmacol Toxicol Methods* 78: 13-31.
- Rees DA, Alcolado JC 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 22: 359-70.
- Rerup CC 1970. Drugs producing g diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 22: 485-518.
- Roep BO 2003. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* 46: 305-21.
- Roep BO, Atkinson M, van Herrath M 2004. Satisfaction (not)guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. *Nature Rev Immunol* 4: 989-97.

- Root MA, Chen KK 1952. Experimental diabetes produced by 8-hydroxyquinoline. *J Pharmacol Ther* 104: 404-11.
- Sanchez-Margalat V, Valle M, Ruz FJ et al., 2002. Elevated plasma total homocysteine levels in hyperinsulinemic obese subjects. *J Nutr Biochem* 13: 75-9.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuoka G et al., 1997. Pathophysiological significance of the obese gene product leptin in ventromedial hypothalamus (VMH) lesioned rats: evidence for loss of its satiety in VMH lesioned rats. *Endocrinol* 138: 947-54.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB 1994. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. *Diabetes* 43: 1326-33.
- Scullion SMJ, Gurgul-Convey E, Elsner M et al., 2012. Enhancement of homocysteine toxicity to insulin secreting BRIN-BD 11 cells in combination with alloxan. *J Endocrinol* 214: 233-8.
- Seon YD, Lee TH, Lee MC 1999. Changes of glomerular basement membrane components in vacor-induced diabetic nephropathy. *Korean J Intern Med* 14: 77-84.
- Sharma S, Jaya D, Jha AK, Sharma S 2010. Experimental models of diabetes. *Int J Res Ayurveda Pharmacy* 1: 292-30.
- Smith R 2001. Animal research: the need for a middle ground. *Br Med J* 322: 248-9.
- Strandel E, Eizirik DL, Korsgren O, Sandler S 1988. Functional characteristics of cultured mouse pancreatic islets following exposure to different streptozotocin concentrations. *Mol Cell Endocrinol* 59: 83-91.
- Suzuki N, Aizawa T, Asanuma N et al., An early insulin intervention accelerates pancreatic beta cell dysfunction in young Goto-Kakizaki rats, a model of naturally occurring non insulin dependent diabetes. *Endocrinol* 138: 1106-10.
- Szkudelski T 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in beta cells of rat pancreas. *Physiol Res* 50: 536-46.
- Takasu N, Komiya I, Asawa T et al., 1991. Streptozotocin and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 40: 1141-5.
- Taniguchi H, Yamashiro Y, Chung MY et al., 1989. Vacor inhibits insulin release from islets in vitro. *J Endocrinol Invest* 12: 273-5.
- The Merck Index, Fourteenth Edition. Merck & Co Inc. Whitehouse Station, New Jersey, USA 2006.
- Thomas G, Ramwell P 1989. Streptozotocin: a nitric oxide carrying molecule and its effect on vasodilation. *Eur J Pharmacol* 16: 279-80.
- Tjalve H, Wilander E, Johnsson EB 1976. Distribution of labeled streptozotocin in mice: uptake, and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol* 69: 455-6.

Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M et al., 2002. Persistent improvement of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta cell mass during the prediabetic period with glucagon like peptide 1 or exendin 4. *Diabetes* 51: 1443- 52.

Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H 1982. Protection by superoxide dismutase, catalase and poly ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan and streptozotocin induced islet DN strands breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem* 257: 6054-8.

Xue B, Sukumaran S, Nie J et al., 2011. Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Plos one* 6: e 17386.

Weir GC, Aguayo-Mazzucato C, Bone-Weir S 2013. Beta cell differentiation in diabetes is important but what is it? *Islets* 5: 233-7.

Weiss RB 1982. Streptozotocin a review of its pharmacology, efficacy and toxicity. *Cancer Treat Rep* 66: 427-38.

Wicker LS, Todd JA, Peterson LB 1995. Genetic control of auto immune diabetes in NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13. 179-200.

Winterbourn CC, Munday R 1989. Glutathione mediated redox cycling of alloxan. Mechanism of superoxide dismutase inhibition and metal-catalyzed OH formation. *Biochem Pharmacol* 38: 271-7.

CAPÍTULO 3. HORMÔNIOS DO PÂNCREAS

O pâncreas é um órgão glandular que é ao mesmo tempo exócrino, produzindo e secretando enzimas digestivas, como tripsina, RNase, alfa amilase e fosfolipase-2, via ducto pancreático, e endócrino produzindo hormônios através das células das ilhotas de Langerhans.

As ilhotas de Langerhans são separadas do pâncreas endócrino por uma fina camada de tecido conjuntivo. Em mamíferos adultos, a massa das ilhotas corresponde a cerca de 1- 2 % do pâncreas. Pelo menos, cinco tipos de células (α , β , δ , ϵ e PP) foram identificadas nas ilhotas [Mandarim-de Lacerda 2019; Sakata, Yoshimatsu, Kodama 2019].

a) células alfas (α) que produzem e secretam o hormônio glucagon, correspondendo a cerca de 20 % das células das ilhotas.

b) células betas (β) produzindo e secretando os hormônios insulina e amilina, na proporção de 100: 1 respectivamente e ocupando cerca de 76% das células das ilhotas.

c) células deltas (δ) produzindo e secretando o hormônio somatostatina e ocupando menos de 10% das células das ilhotas

d) células épsilons (ϵ) identificadas em 2002 [Wierup, Svensson et al., 2002], produzindo o hormônio grelina (ghrelin) e ocupando menos de 1% das células das ilhotas.

e) células PP (gama ou F) fornecendo o polipeptídeo pancreático e ocupando menos de 5% das células das ilhotas.

O termo hormônio refere-se a qualquer substância, que carrega consigo um sinal para gerar algum tipo de alteração ao nível celular. Os hormônios são classificados de acordo com a distância que percorrem, a fim de exercerem suas ações. Dessa forma, nós temos o seguinte: 1. hormônios endócrinos, aqueles que são sintetizados num tecido ou glândula, são levados pela corrente circulatória até alcançar a célula alvo, a qual deve expressar o receptor cognato e estar situado longe do local da liberação do hormônio. Como exemplo, podemos citar a insulina e a epinefrina; 2. hormônios parácrinos, aqueles que sintetizados por uma célula ou tecido viajam uma distância relativamente curta para interagir com seu receptor cognato. Exemplo, as prostaglandinas e vários fatores de crescimento e 3. hormônios autócrinos, aqueles que atuam nas células onde foram produzidos. Exemplo, interleucina-2 que estimula a proliferação das células T. O tecido responde de forma correta a determinado estímulo que lhe é específico. A exatidão dessa resposta aos sinais é definida pelo hormônio e seu receptor cognato.

O pâncreas produz os seguintes hormônios: a insulina, o glucagon, a somatostatina, a amilina e a grelina.

INSULINA

A insulina é um hormônio de natureza peptídica produzida pelas células beta das ilhotas de Langerhans. Porque o nome Langerhans para essas células? O nome vem de um estudante de medicina na Alemanha, Paul Langerhans que no ano de 1869 estudando o pâncreas verificou, que esse órgão era constituído por dois tipos distintos de células, as células acinares responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e células dispostas em cachos formando ilhotas, que segundo Langerhans conferiam uma segunda função ao pâncreas [Davis, Granner 1995].

Essa segunda função do pâncreas ficou evidente quando em 1889, Minkowski e von Mering estudando as funções desse órgão, observaram que cães pancreatectomizados exibiam uma

síndrome semelhante ao diabetes dos seres humanos [Minkowski 1989].

A história da insulina se confunde com a história do diabetes. Oskar Minkowski, o primeiro pesquisador a realizar uma pancreatectomia em cães, nasceu em 1858 na Lituânia, então parte do Império Russo. Estudou medicina em Königsberg, Freiburg e Strasbourg, tendo se doutorado em 1881 [Kyle, Steensma, Shampo 2005]. Naquela época, Claude Bernard, um fisiologista no laboratório de von Mering, desafiou Minkowski a provar que os animais não sobreviveriam sem o pâncreas. Minkowski aceitou o desafio e realizou a primeira pancreatectomia total em cães. Sem o pâncreas o animal desenvolveu severo diabetes manifestado por glicosúria, polidipsia, poliúria, fraquesa e perda de peso [Kyle, Steensma, Shampo 2005]. Minkowski e von Mering descreveram que a glicosúria do animal persistiu apesar de jejum de 48 horas, a urina continha quantidades significantes de acetona e a glicemia variava de 0,3 a 0,46 g/dL [Minkowski 1989]. O fato da pancreatectomia total levar o animal a apresentar os sintomas de diabetes foi uma descoberta histórica, sendo o ponto de partida para pesquisas que provaram que o pâncreas produz uma secreção interna, levando a descoberta da insulina e sua aplicação para o tratamento do diabetes [Houssay 1952].

Quando ficou claro aos pesquisadores, que a retirada do pâncreas do organismo causava diabetes, o uso de extratos pancreáticos para o tratamento da doença começaram a ser pesquisados e testados [Kahn, Sechter 1992]. No começo de 1900 Gurg L Zuelzer um bioquímico alemão, em Berlim tentou tratar diabéticos em fase terminal com extratos de pâncreas, observando uma melhora temporária. Em 1911 E.L. Scott um estudante da Universidade de Chicago, fez uma tentativa para isolar um princípio ativo do pâncreas. Usando extratos alcoólicos, Scott tratou cães diabéticos com resultados encorajadores. Contudo, tendo-se em vista a falta de um controle melhor da glicemia, o seu professor considerou os experimentos inconclusivos [Davis, Granner 1995].

Entre 1916 e 1920 o fisiologista romeno Nicolas Paulesco através de uma série de experimentos verificou que injeções de extratos pancreáticos reduzia a glicosúria e os corpos cetônicos [Paulescu 1920; Roth, Qureshi et al., 2012].

Finalmente, em 1921 Frederick G Banting um jovem cirurgião canadense conseguiu convencer o professor de Fisiologia John R Macleod a permitir que ele freqüentasse o laboratório a fim de pesquisar o princípio ativo do pâncreas que regulava a glicemia. Como Banting naquela época não era um pesquisador, suas idéias sobre os experimentos eram muito vagas. Então, Macleod definiu o conjunto de experimentos a serem realizados. Para isso apresentou James B Collip, um fisiologista e bioquímico que estava em ano sabático em seu laboratório e ajudou Charles H Best, ainda um estudante de medicina a se tornar assistente de Banting [Roth, Qureshi et al., 2012]. Trabalhando em equipe, eles conseguiram obter do pâncreas um extrato ácido-etanólico, o qual se mostrou efetivo na redução da concentração da glicose no sangue de cães diabéticos. No entanto, não foi fácil. Após várias tentativas frustradas, eles finalmente conseguiram um extrato que funcionava contra o diabetes. O primeiro paciente a receber o extrato pancreático por eles preparado foi um adolescente de 14 anos, Leonard Thompson [Banting, Best et al., 1922], que apresentava uma glicemia de 500 mg/dL (28 mM) e excretava de 3 a 5 litros de urina por dia. Apesar do paciente ter sido submetido a uma rígida dieta (450 Kcal/dia), ele continuou a excretar grandes quantidades de glicose (glicosúria) [Davis, Granner 1995]. O tratamento com extratos pancreáticos melhorou o estado diabético do paciente. Por esse trabalho desenvolvido na Universidade de Toronto, Frederick G Banting e John J R Macleod foram agraciados com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1923. Banting dividiu seu prêmio com Best e Macleod com Collip. Ao receber o prêmio Nobel, Banting em seu discurso frisou “com o alívio dos sintomas desta doença e com o aumento do fortalecimento e vigor resultante de uma dieta não tão rígida, o diabético pessimista e melancólico se tornou otimista e feliz [Roth, Qureshi et

al., 2012]. O prêmio Nobel trouxe desavenças à equipe, cada um buscando para si o crédito pelo feito [Roth, Qureshi et al., 2012]. É interessante ver como a vaidade humana se faz sentir até na ciência; Banting e Best além de promover os créditos da descoberta a eles, estavam tirando os créditos devidos a Macleod e Collip [Bliss 1993].

Aqui cabe uma pergunta: como foi que F. Banting se interessou em estudar as células beta do pâncreas? Esse interesse surgiu devido a uma leitura de um artigo e relato de um paciente, que teve bloqueio do ducto pancreático devido a uma pedra com atrofia do pâncreas exócrino, porém deixando intato as ilhotas de Langerhans. Banting acreditava, que aí estava a fonte da secreção interna [Barron 1920]. Como se pode perceber a leitura sempre abre novas perspectivas para a solução de problemas. Agora a pergunta que nos vem a mente é: de onde surgiu o termo insulina para o hormônio produzido pelas células beta do pâncreas? Em 1909, Eugene Opie relatou uma degeneração hialina nas ilhotas em pacientes diabéticos, um achado que levou em 1916 Edward Sharpey-Schafer a sugerir que as ilhotas de Langerhans produzia um hormônio que regulava a glicose e ao qual ele deu o nome de insulina. Quando Banting e Best conseguiram isolar o hormônio pancreático eles queriam denominá-lo “isletina”. Porém, Macleod em cujo laboratório o trabalho foi realizado, insistiu no uso do termo insulina [Macleod 1978; Eknayan, Nagy 2005].

QUÍMICA DA INSULINA

A insulina é um hormônio de natureza protéica. Proteínas são moléculas com funções importantes em quase todos os processos biológicos. As proteínas funcionam como catalisadores orgânicos, no transporte e armazenamento de outras moléculas, fornecem suporte mecânico e proteção imune, geram movimentos, transmitem impulsos nervosos e controlam o crescimento e diferenciação. Proteínas são polímeros lineares formados por aminoácidos. Quando um polímero for constituído por mais de 50 amino ácidos, ele recebe o nome de proteína. Por outro lado, quando o polímero for formado por um número menor que 50 aminoácidos, ele recebe o nome de peptídeo.

Os aminoácidos constituintes de proteínas são codificados geneticamente. Um amino ácido é constituído por um carbono (C) central, o carbono alfa, ao qual é ligado um grupo amino ($-\text{NH}_2$), um grupo carboxila ($-\text{COOH}$), um hidrogênio (H) e um grupo R que varia de acordo com o aminoácido. Os aminoácidos apresentam isomeria, de modo que podem ser ou L-aminoácidos ou D-amino-ácidos. Se projetarmos a fórmula de um amino ácido num espelho, obtemos sua imagem especular, isto é o seu isômero. As proteínas são constituídas somente pelo isômero L. Existem 21 aminoácidos codificados geneticamente. Até a pouco tempo atrás, eram conhecidos somente 20 aminoácidos, porém em 1988 foi descrito o selenocisteína, com um código específico para mRNA e tRNA. Como sua estrutura é similar a cisteína, com a diferença de conter o selênio no lugar do enxofre ele recebeu o nome de selenocisteína. O nome dos 21 amino ácidos codificados geneticamente são representados por dois tipos de abreviaturas; um tipo contendo três letras e outro tipo contendo somente uma letra.

Uma série de amino ácidos unidos por ligações peptídicas forma a cadeia polipeptídica e cada amino ácido no polipeptídeo recebe o nome de resíduo. A ligação entre os aminoácidos para formar o polímero é de natureza amídica ou como é conhecida, ligação peptídica. O grupo carboxila de um amino ácido reage com o grupo amínico do outro amino ácido formando um dipeptídeo e água.

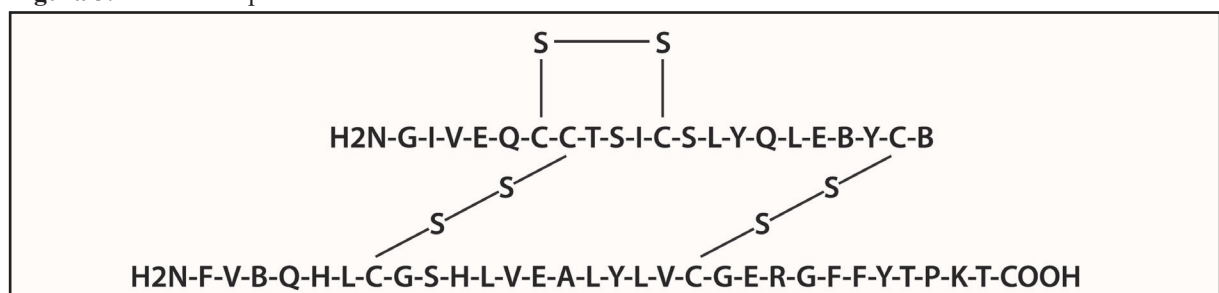


Quadro 3.1 - Amino ácidos e suas abreviaturas

Nome	Abreviaturas		Nome	Abreviaturas	
Glicina	Gly	G	Serina	Ser	S
Alanina	Ala	A	Treonina	Thr	T
Valina	Val	V	Cisteína	Cys	C
Leucina	Leu	L	Asparato	Asp	D
Isoleucina	Ile	I	Glutamato	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F	Lisina	Lys	K
Tirosina	Tyr	Y	Arginina	Arg	R
Prolina	Pro	P	Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W	Glutamina	Gln	Q
Selenocisteína	Sec	U	Asparagina ou Aspartato	Asx	B
Asparagina	Asn	N	Glutamina ou Glutamato	Gls	Z
Metionina	Met	M			

A sequência de amino ácidos, a ligação peptídica e a localização das pontes dissulfeto, representam a estrutura primária de uma proteína. Conhecer a estrutura primária de uma proteína se reveste de importância por fornecer informações para que se possa entender não só sua estrutura como, também, sua ação e biossíntese. Contudo, a estrutura de uma proteína apresenta outros níveis de organização, conhecidas como estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. A estrutura secundária refere-se ao local de dobramento do polipeptídeo em hélice (forma helicoidal) ou folha dobrada ou ainda conformação ao acaso. A estrutura terciária refere-se a estrutura tridimensional do polipeptídeo. Isso inclui as relações conformacionais no espaço das cadeias laterais. A estrutura quaternária refere-se a associação não covalente de subunidades peptídicas, numa proteína multi-subunidades. A insulina é um hormônio de natureza protéica consistindo de duas cadeias polipeptídicas, uma delas a cadeia A contendo 20 aminoácidos, enquanto a outra cadeia, a B é formada por 31 aminoácidos. As duas cadeias polipeptídicas estão ligadas entre si por duas pontes dissulfeto (-S-S-).

A figura 3.1 mostra que o carbono terminal, isto é, o grupo carboxílico (-COOH) livre da cadeia A é a asparagina (B) enquanto o da cadeia B é a treonina (T). Por outro lado, o N-terminal, isto é, o grupo aminidico (-NH₂) livre da cadeia A é a glicina (G), enquanto o da cadeia B é a fenil alanina (F).

Figura 3.1- Estrutura primária da insulina usando abreviaturas de uma única letra

A determinação da sequência de amino ácidos da insulina usada por Frederick Sanger [Sanger 1945; Sanger 1947; Sanger 1949a; Sanger 1949b; Sanger, Tuppy 1951a; Sanger, Tuppy 1951b; Sanger 1953; Ryle, Sanger et al., 1955; Sanger 1988], prêmio Nobel por seus trabalhos sobre a insulina, se baseou numa série de procedimentos como hidrólise ácida (que destrói certos aminoácidos mas preserva outros), hidrólise alcalina usado para preservar certos aminoácidos como o triptofano; hidrólise enzimática, usando nestes casos enzimas específicas para certas ligações peptídicas. Nunca um único procedimento foi usado isoladamente, sempre foi usado uma combinação de procedimentos. Uma vez hidrolisada, parcial ou totalmente foram usados métodos de separação como cromatografia em papel, em camada delgada, de troca iônica, eletroforese analítica. Como se pode deduzir, até chegar a sequência completa da estrutura primária da insulina, foi um trabalho insano e ao mesmo tempo muito importante para o estudo do sequenciamento de proteínas. Sanger precisava de um reagente que reagisse com os aminoácidos das proteínas e ao mesmo tempo o produto da reação fosse estável à hidrólise. Para isso ele utilizou o 1-fluoro-2,4 dinitro benzeno (FDNB), o qual reage com o grupo aminico livre formando um produto estável resistente a hidrólise. Usando essa metodologia, Sanger chegou a conclusão de que a insulina era formada por duas cadeias polipeptídicas ligadas por duas pontes dissulfeto, além de descrever uma ligação dissulfeto intra cadeia.

BIOSSÍNTESE DA INSULINA

O dogma central da Biologia Molecular estabelece que o DNA (ácido desoxiribonucleico) armazena informações genéticas, que determinam a sequência de nucleotídeos do RNA (ácido ribonucléico), um processo conhecido como transcrição. O RNA, por sua vez, determina a estrutura da proteína a ser formada, isto é, a sequência de aminoácidos, num processo que ocorre nos ribossomos, que recebe o nome de tradução. Como podemos concluir, o dogma central estabelece um fluxo de informações do DNA para o RNA e deste para a proteína.

Após sua síntese na forma de pré-pro-proteína, esta pode sofrer modificações, ditas modificações pós-tradução, até chegar à forma ativa. Alguns hormônios, entre eles, a insulina são sintetizados como precursores, chamados pró-hormônios, que possuem muito pouca ou nenhuma atividade hormonal. O peso molecular do precursor é muito maior do que o do produto final. O precursor da insulina a pré-pro-insulina é uma molécula formada por 110 resíduos de aminoácidos, dos quais 24 resíduos terminais constituem o peptídeo sinal, o qual serve para transportar a molécula, recémformada através da membrana do retículo endoplasmático.

No lúmen do retículo endoplasmático a pré-pro-insulina sofre um processo de clivagem por enzimas proteolíticas, que retiram o peptídeo sinal, formando então a pró-insulina, uma proteína contendo 86 resíduos de amino-ácidos. Dentro da cisterna do retículo endoplasmático a pró-insulina sofre o processo de dobramento e formação das ligações dissulfetos para gerar a estrutura terciária nativa. Uma vez completado esse processo de dobramento e formação das ligações dissulfetos, a pró-insulina é transferida para o aparelho de Golgi e acondicionada sob a forma de vesículas de secreção imaturas recobertas por uma proteína chamada clatrina (*clathrin*) [Steiner, Park et al., 2009]. A clatrina é uma proteína de revestimento, não glicosilada, apresentando um peso molecular de 180 KDa, cuja sequência de aminoácidos é altamente conservada. De um modo geral a clatrina se constitui na principal proteína dos componentes que revestem as vesículas, numa proporção de cerca de 70%. Também fazem parte da proteína de revestimento 25% de polipeptídeos de peso molecular entre 50–100 KDa e 5 % de polipeptídeos de peso molecular de 35 KDa.

A medida que a vesícula vai sendo amadurecida o revestimento de clatrina é removido. Nesse procedimento de maturação o pH das vesículas cai de pH 6,5 para pH 5,5-5,0 no grânulo maduro.

O pH mais ácido favorece as ações de convertases (endopeptidases) e da carboxipeptidase, enzimas proteolíticas, no sentido de cortar o segmento de ligação, removendo amino-ácidos básicos das extremidades terminais do polipeptídeo, dando origem aos produtos insulina e peptídeo C [Steiner, Park et al., 2009]. O peptídeo C permanece intato nas células betas, sendo armazenado e secretado durante a secreção ativa em quantidades equimoleculares com a insulina [Rubenstein, Clark et al., 1969].

Esse achado possibilitou o desenvolvimento de métodos, para seu isolamento e uso clínico, através de sua determinação por imunoensaio o qual fornece informações sobre o funcionamento das ilhotas [Brandenburg 2008; Little, Rohlfing et al., 2008]. Hoje o ensaio do peptídeo C é usado rotineiramente para medidas de secreção de insulina. A concentração do peptídeo C fornece uma avaliação exata da função das células beta, tendo se tornado um importante marcador da secreção de insulina em pacientes diabéticos [Polonsky, Licinio-Paixão et al., 1986; Kjems, Volund, Madsbad 2001]. Concentrações altas do peptídeo C estão associadas com a melhora da concentração de hemoglobina glicada (HbA1c), menos hipoglicemia, menos retinopatia e menos nefropatia [Steffes, Sibley et al., 2003].

Um aspecto que chamou muito a atenção dos pesquisadores é o fato da insulina ser formada por duas cadeias polipeptídicas, uma de 21 resíduos de amino ácidos e outra composta por 30 resíduos de amino ácidos e o seu precursor, a pró-insulina apresentar 86 resíduos de amino ácidos, dos quais 35 são clivados para dar o hormônio ativo. Qual o papel desempenhado por esse peptídeo de ligação na biossíntese da insulina? Esse peptídeo se constitui num importante centro de nucleação para facilitar o dobramento das cadeias A e B e para o alinhamento e formação das ligações dissulfeto [Kitabci 1977].

A conversão da pró-insulina para insulina ocorre inteiramente dentro da célula, pela ação de enzimas proteolíticas especializadas, no recém-formado grânulos de secreção. Essa conversão é realizada em condições de pH ótimo das enzimas envolvidas, as convertases (PC 1/3 e PC2), isto é, condições ácidas. Essas convertases (PC de pró-insulina convertase) atuam na junção do peptídeo de ligação aos terminais das cadeias A e B da insulina. Nessa conversão há a ativação da enzima ATPase vacuolar, responsável pelo abaixamento do pH para criar condições apropriadas para a ação das enzimas proteolíticas [Louagie, Taylor et al., 2008].

Examinando-se a estrutura primária do peptídeo C humano observa-se a ausência de aminoácidos básicos e ao mesmo tempo observa-se a presença de cinco resíduos de aminoácidos ácidos e muitos resíduos de glicina. A presença de resíduos de glicina na cadeia polipeptídica confere a esta flexibilidade facilitando o dobramento da cadeia. Em solução o peptídeo C humano não apresenta uma conformação definida, assumindo uma estrutura em espiral ao acaso (Figura 3.2)

Figura 3.2 - Sequência de amino ácidos do peptídeo C humano

E-A-E-D-L-Q-V-G-Q-V-E-L-G-G-G-P-G-A-G-S-L-Q-P-L-A-L-E-G-S-L-Q

Quando se pensava que o peptídeo C fosse uma molécula biologicamente inerte, evidências experimentais apontam o contrário. O peptídeo C liga a membranas celulares e ativa vias de sinalização intracelulares resultando na estimulação das atividades do sistema $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ e da sintase do óxido nítrico endotelial [Johansson, Sjoberg, Wahren 1992; Wahren, Ekberg et al., 2000]. Através de espectroscopia de correlação fluorescente e usando peptídeo C marcado com rodamina (um corante) foi demonstrado, que o peptídeo C liga especificamente células dos túbulos renais, fibroblastos de pele e células endoteliais [Rigler, Pramanik et al., 1999]. Por outro lado, o peptídeo C exerce um efeito estimulatório sobre a atividade do sistema ATPase [Ohtomo, Aperia et al., 1996; Tsimaratos, Roger et al., 2003], provavelmente via proteína quinase C (PKC). A proteína quinase C é uma enzima que quando ativada fosforila resíduos de serina e treonina de muitas proteínas. Já, a hidrólise do ATP, pela ATPase fornece a energia necessária para o transporte ativo de Na^+ para fora da célula e de K^+ para dentro da célula.

Evidências obtidas *in vitro*, apontam para a noção de que o peptídeo C promove a vasodilatação, via liberação de óxido nítrico (NO) [Wallerath, Kunt et al., 2003]. O óxido nítrico é gerado por uma enzima chamada sintase do óxido nítrico. Devido ao fato do óxido nítrico rapidamente permear membranas biológicas, ele pode ser produzido num tipo de célula, por exemplo células endoteliais se difundir para células vizinhas onde exerce sua ação, isto é, ativar algum sistema enzimático. O peptídeo C humano, bem como, o seu pentapeptídeo da extremidade C (extremidade da cadeia com o grupo carboxílico livre), isto é, E-G-S-L-Q são efetivos em aumentar a concentração intracelular do cálcio em células renais humanas sugerindo, este fato, que o cálcio intracelular funciona como um segundo mensageiro na transdução de sinal do peptídeo C [Shafqat Juntti-Berggren et al., 2002]. Esse aumento da concentração de cálcio intracelular se faz via influxo de cálcio extracelular, uma vez que na presença de um quelante de cálcio o fenômeno não ocorre [Wallerath, Kunt et al., 2003]. Outros estudos apontam um possível papel desempenhado pelo peptídeo C em efeitos transcricionais, com implicação de atividade de fator de crescimento. Foi descrito que a pró-insulina é internalizada em células [Lindahl, Nyman et al., 2007], localizando-se no nucléolo, onde promove a transcrição de genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA), bem como, que o peptídeo C estimula a proliferação de condrócitos. A partir desses dados foi concluído que o peptídeo C exerce efeitos transcricionais e apresenta atividade de fator de crescimento [Lindahl, Nyman et al., 2010]. Tendo-se em vista as evidências experimentais, podemos esquematizar os efeitos do peptídeo C da seguinte maneira: (1) O peptídeo C liga a um receptor de membrana acoplado a proteína G; (2) O peptídeo C envia um sinal que abre o canal de cálcio, permitindo que o cálcio extracelular penetre na célula, aumentando consequentemente sua concentração intracelular; (3) O aumento da concentração intracelular do cálcio estimula a sintase do óxido nítrico, aumentando a síntese do óxido nítrico (NO) endotelial, provocando vasodilatação; (4) O aumento da concentração intracelular do cálcio ativa o sistema $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, e como resultado há a saída de sódio para fora da célula e ao mesmo tempo entrada de potássio; (5) O peptídeo C é internalizado dentro da célula, indo se localizar no nucléolo onde exerce efeitos transcricionais com implicação de atividade de fator de crescimento.

REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE INSULINA

Antes de abordarmos a regulação da síntese da insulina, vamos rever embora de forma sucinta os fundamentos da síntese protéica. Vimos anteriormente, que o dogma central da Biologia Molecular estabelece, que o DNA armazena informações genéticas que são transferidas para o RNA, o qual por sua vez dita a ordem de entrada dos aminoácidos para formar a cadeia polipeptídica. Tanto o DNA quanto o RNA são polímeros de nucleotídeos, logo os nucleotídeos são as unidades monoméricas dos ácidos nucleicos. Essa unidade monomérica é formada por

uma base nitrogenada, um carboidrato e um ou mais grupos fosfóricos. As bases nitrogenadas encontradas no DNA são adenina (A), guanina (G) ambas derivadas da purina, citosina (C) e timina (T) estas derivadas da pirimidina. No RNA são encontradas as mesmas bases com exceção da timina que é substituída pelo uracil (U). O carboidrato do DNA é a desoxiribose enquanto o RNA é a ribose.

Uma base nitrogenada glicosilada, isto é, contendo um carboidrato, ribose ou desoxiribose forma o chamado nucleosídeo. Nucleosídeo que contém a pentose ribose são conhecidos como ribonucleosídeos, enquanto os que contém a desoxiribose são os desoxiribonucleosídeos. Entre os ribonucleosídeos encontrados no DNA destacamos a adenosina (A), guanosina (G), citidina (C) e uridina (U); já entre os desoxiribonucleosídeos temos desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG), desoxicitidina (dC) e desoxitimidina (dT). Já os nucleotídeos são ésteres fosfóricos de nucleosídeos.

Quando o nucleotídeo contém apenas um grupo fosfato é chamado nucleosídeo mono fosfato, se contém 2 grupos fosfatos é chamado nucleosídeo di fosfato e se contém 3 grupos fosfatos nós temos o nucleosídeo trifosfato. O DNA é sintetizado pela adição sucessiva de desoxinucleotídeos pela enzima DNA polimerase. Essa reação se faz entre o grupo fosfato de um desoxinucleotídeo com o grupo hidroxila de outro desoxinucleotídeo

A estrutura covalente dos ácidos nucleicos permite que essas macromoléculas carreguem informações sob a forma de sequência de bases ao longo da cadeia. A molécula do DNA é formada por duas cordas torcidas entre si formando uma dupla hélice. A formação da dupla hélice é facilitada pelo pareamento das bases nitrogenadas, que ficam no interior da dupla hélice. Esse pareamento ocorre pela formação de ligações de hidrogênio entre as bases. Por exemplo, a adenina (A) forma um par com a timina (T). O modelo de dupla hélice e a presença de pares de bases específicas numa corda determina a sequência da outra corda. Na molécula do DNA vamos sempre encontrar pares formado por G-C e A-T. A separação das cordas de uma molécula faz da corda separada um molde para novas moléculas. O DNA de eucariotas encontra-se associado a proteínas formando a chamada cromatina. Esta, em células que não estão se dividindo são amorfas e dispersas no núcleo, porém em células que estão para se dividir se tornam organizadas em estruturas compactas chamadas cromossomos. As principais proteínas que estão associadas ao DNA são as histonas (H2A, H2B, H3 e H4) formando o nucleossomo. A informação contida no DNA só se torna útil quando for expressa para a produção do RNA (transcrição) e do RNA para proteínas (tradução). Nos eucariotas a transcrição e a tradução ocorrem em diferentes compartimentos da célula. A transcrição ocorre no núcleo, enquanto a tradução se realiza no citossol. A separação espacial e temporal desses dois processos permite, que a célula possa regular a expressão gênica.

O RNA é um polímero de unidades monoméricas de ribonucleotídeos. Diferentemente do DNA, o RNA é constituído por uma única corda de ribonucleotídeos. A síntese do RNA é catalisada pela enzima RNA polimerase, a qual requer um molde da dupla hélice do DNA, precursores ativados por ATP (adenosina trifosfato), GTP (guanosina trifosfato), UTP (uridina trifosfato) e CTP (citidina trifosfato), além de metais divalentes (Mg^{2+} e Mn^{2+}).

O processo de transcrição é dividido em três etapas: a primeira etapa, início, refere-se ao reconhecimento de uma sequência específica do DNA pela RNA polimerase. Esta sequência específica é conhecida como sequência promotor ou sítio promotor. Os promotores são, portanto, aquelas sequências que influenciam o início da transcrição gênica. Os promotores regulam a atividade do gene ao apresentarem múltiplos sítios de ligação de fatores de transcrição. A segunda etapa refere-se ao alongamento da cadeia, isto é, a adição das unidades monoméricas de nucleotídeos para formar o polímero. A terceira fase refere-se ao término da síntese do RNA

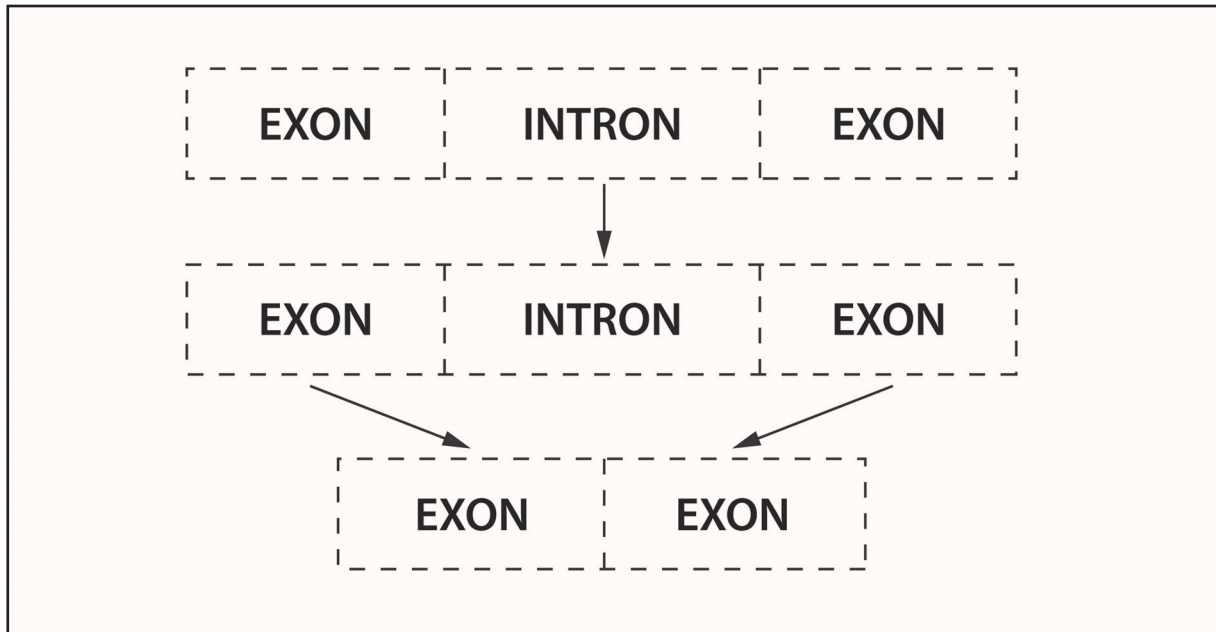
e sua liberação.

O gene que codifica proteínas tem um sítio promotor com sequência chamada “TATA Box”. Um sítio promotor é um segmento específico do DNA adjacente a um gene no qual a RNA polimerase se liga para iniciar a transcrição do gene. TATA Box é uma sequência de DNA conservada rica em A e T presente nos elementos promotores de muitos genes eucariotes e ocorre a cerca de 25 a 30 nucleotídeos acima do sítio de iniciação da transcrição. Muitos sítios promotores têm o “CAAT Box” com uma sequência GGNCAATCT. O RNA é sintetizado por três tipos de RNA polimerase, as quais diferem na especificidade ao molde, localização no núcleo e susceptibilidade aos inibidores. A RNA polimerase I, localizada no nucléolo, realiza a transcrição a partir de um único promotor presente no gene rRNA, que circunda o sítio de iniciação. A RNA polimerase II localiza-se no nucleoplasma, sintetiza os precursores do RNA mensageiro, bem como pequenas moléculas de RNAs. A RNA polimerase III, também localizada no nucleoplasma sintetiza todos os RNAs de transferência. A enzima RNA polimerase é guiada ao sítio de iniciação, onde forma um complexo através do contato inicial do promotor com fatores de transcrição, conhecidos como TFII (TF de *transcription factors*) e o II refere-se a RNA polimerase II. Fatores de transcrição individuais são conhecidos como TFIIA, TFIIB etc. O TFIID é um complexo multisubunidades que contém a proteína ligante do TATA box (TBP) e um número de fatores associados ao TBP (TAFs). O início da transcrição começa com a ligação do TFIID ao TATA box, graças ao reconhecimento do TATA box, pela proteína que liga o TATA box (TBP) um componente do complexo TFIID. Após se ligar ao “TATA box”, o TBP controla a montagem do complexo de pré-iniciação por adição ordenada de vários fatores de transcrição e RNA polimerase II.

A atividade de muitos promotores, são aumentadas por outro tipo de elemento chamado “*enhancers*”, isto é, intensificadores. Estes intensificadores nada mais são do que uma sequência no DNA, localizado longe do sítio de iniciação da transcrição e que estimula o processo. O processo transcricional começa pela ligação da enzima RNA polimerase ao sítio promotor do gene e termina no chamado sítio de terminação. O RNA é sintetizado sob três formas distintas: o mRNA, isto é, o RNA mensageiro é o responsável por levar a mensagem para a síntese correta de proteínas, servindo de molde para o processo; o tRNA, isto é, o RNA de transferência é o responsável pelo transporte do aminoácido sob uma forma ativa. Existe pelo menos um tRNA para cada amino ácido e rRNA, isto é, o RNA ribossômico o principal componente dos ribossomos, local onde ocorre a síntese protéica e que desempenha um papel catalisador e estrutural.

O RNA mensageiro é sintetizado primeiramente sob a forma de um precursor o pré-mRNA, cuja molécula contém uma parte intermediária desprovida de informação genética e que recebe o nome de intron. O intron liga-se nas duas laterais a sequências, estas sim carregando informações genéticas e que recebe o nome de exons. Para que o mRNA maduro seja formado alguns procedimentos são necessários: primeiro o intron deve ser removido. Uma vez removido o intron, os dois exons são reunidos para formar o mRNA, um processo chamado de “*splicing*”. O “*splicing*” ocorre graças a cooperação de várias pequenas moléculas de RNA e proteínas formando o chamado “*spliceosome*”. O *spliceosome* é um complexo de snRNA (*small nuclear RNA*) e proteínas que interagem com a porção terminal de um intron no pré-mRNA causando a liberação do intron e juntando as porções terminais livres de exons adjacentes. No núcleo das células são encontrados muitos tipos de pequenas moléculas de RNA (*small nuclear RNAs*) que são essenciais para o “*splicing*” do mRNA (Figura 3.3). Estas pequenas moléculas de RNA são associadas com proteínas específicas formando o complexo “*small nuclear ribonucleoproteins particles*” (pequenas partículas de ribonucleoproteínas nucleares) snRNPs ou como alguns pesquisadores o nomeiam “*Snurps*”.

Figura 3.3 - Esquematização do “splicing” durante a síntese do mRNA maduro



Uma vez sintetizados os RNAs saem do núcleo para o citoplasma, local onde exercem suas funções. A saída do núcleo se dá através de poros, ligados a proteínas formando partículas de ribonucleoproteínas. O “*splicing*” e a exportação do RNA asseguram o controle de qualidade para a integridade do RNA. De um modo geral o código que determina o fim da síntese de um mRNA (UAA, UAG ou UGA) está geralmente localizado no último exon. Estes códigos são lidos por proteínas específicas chamadas fatores de liberação RFs (*releasing factors*). O fator de liberação 1, RF1 reconhece o UAA e UAG, enquanto o RF2 reconhece o UAA e UGA. Um terceiro fator de liberação, o RF3 funciona como mediador na interação entre o RF1 e RF2 e os ribossomos.

TRADUÇÃO

A tradução, isto é, a síntese de proteínas guiado pelo mRNA ocorre nos ribossomos. Estes, são complexos moleculares que coordenam a interação de tRNAs carregados com os aminoácidos específicos, o mRNA que traz consigo os códigos para a entrada de aminoácidos na cadeia e proteínas, responsáveis pela síntese protéica. O ribossomo de procariontes (os mais estudados pelos pesquisadores) pode ser dissociado em duas subunidades, uma subunidade maior de 50S e outra subunidade menor de 30S. A subunidade de 30S é constituída de 21 proteínas e uma molécula de RNA de 16S. A subunidade de 50S contém 34 proteínas diferentes e duas moléculas de RNA, uma de 23S e outra de 5S. Já os ribossomos de eucariontes apresentam uma subunidade maior de 60S e uma subunidade menor de 40S. A subunidade de 40S contém um RNA de 18S. A subunidade de 60S contém três RNAs, uma de 5S, outra de 28S e uma terceira de 5,8S.

Neste ponto, antes de prosseguirmos cabe uma explicação para os números seguidos da letra S. Essa letra S vem do nome do pesquisador sueco T. Svedberg, que desenvolveu a ultracentrifugação. A ultracentrifuga é um aparelho, que permite a uma proteína ou partícula sujeita a uma força centrífuga se mover na direção da força de centrifugação, a uma velocidade dependente de sua massa. Um meio de quantificar a progressão do movimento é calcular o coeficiente de sedimentação S, de uma partícula usando a seguinte expressão:

$$S = m (1 - v\rho) / f$$

Onde **m** é a massa da partícula, **v** é o volume específico parcial (recíproca da densidade da partícula), **p** é a densidade do meio e **f** é o coeficiente friccional (uma medida da forma da partícula). O coeficiente de sedimentação, uma quantidade que é análoga a mobilidade eletroforética, que representa a velocidade por unidade de força, é comumente expresso em unidades de 10-13 s, conhecido como unidade svedberg. Quanto menor a unidade svedberg, menor a velocidade que a molécula se move no campo de centrifugação. A unidade svedberg ou coeficiente de sedimentação depende da massa da partícula, da velocidade de sua movimentação, do coeficiente friccional, da forma da partícula e da força centrífuga.

O ribossomo possui três sítios de ligação para tRNAs. Estes sítios são conhecidos como sítio A (para amino acil), sítio P (para peptidil) e sítio E (para saída). Moléculas de tRNAs, que levam os aminoácidos específicos para serem introduzidos na cadeia polipeptídica, que está se formando, são ligados ao mRNA pelo par anticódon-codon, facilitado pela estrutura dos tRNAs.

A estrutura tridimensional dos tRNAs, determinada para tRNA de levedura [Kim, Sussman et al., 1974; Robertus, Ladner et al., 1974] e que mostrou ser similar com todos os tRNAs determinados subsequentemente, apresenta uma forma de “*cloverleaf*” (folha de trevo) com a participação de todas as bases na interação de hidrogênio. A interação ou ligação de hidrogênio é aquela que se forma graças a interação que ocorre entre a carga positiva do hidrogênio com uma carga negativa de um elemento de outra molécula. Para o tRNA exercer sua função de transporte do aminoácido, que lhe é específico, precisa reagir com o aminoácido. Essa reação é catalisada por uma enzima chamada amino acil-tRNA sintetase.

Nesta reação há a participação do ATP, o qual fornece a energia necessária para a reação ocorrer. A enzima amino acil-tRNA-sintetase reconhece o tRNA ao qual deve ligar o aminoácido específico pelo anticódon, que é diferente entre os tRNAs. A adição sequencial de amino ácidos para formação da cadeia polipeptídica é realizada do sentido do N-terminal (grupo amino livre) para o C-terminal (grupo carboxílico livre). Isto significa que o último amino ácido a ser adicionado é aquele que vai constituir o C-terminal. Para que o processo biossintético ocorra é necessário a existência de um tRNA iniciador, carregando um amino ácido específico, que no caso de eucariontes é a metionina, bem como o código promotor (AUG). A reação de formação da ligação peptídica ocorre quando o código do mRNA for reconhecido, e isto acontece pelo anticódon do tRNA.

Uma vez formada a ligação peptídica, a cadeia é ligada ao sítio A e depois transferida ao sítio P. O tRNA que ficou livre sai pelo sítio E. Para outro amino ácido ser introduzido, o mRNA deve se mover até que o código do próximo amino ácido a ser adicionado esteja no sítio A. Essa movimentação se verifica com o auxílio de uma proteína chamada fator de alongamento ou translocase. A reação química de formação da ligação peptídica é catalisada pela peptidil-transferase ou peptidil-sintetase, uma enzima existente na subunidade maior do ribossomo. O final da síntese se dá quando o peptidil-tRNA alcança os códigos que determinam o fim do processo, isto é, UAA, UGA ou UAG, os quais são reconhecidos pelos fatores de liberação. Peptidil-tRNA refere-se a tRNA que carrega uma cadeia peptídica em crescimento durante a síntese protéica. A formação da ligação peptídica durante a síntese da proteína requer energia. Como já vimos anteriormente, essa energia é aquela armazenada na ligação aminoacil-tRNA, formado a partir da participação do ATP, a molécula responsável por fornecer a energia necessária. Portanto, o amino acil-tRNA é um composto ativo, isto é, possui energia para ser usado na formação da ligação peptídica. Completada a síntese protéica, as subunidades maiores e menores dos ribossomos, são separados pelo fator de dissociação, que liga a subunidade menor. Esse fator de dissociação foi

identificado como o fator de iniciação IF3. O fator de iniciação IF2 liga o iniciador metionina-tRNA levando-o ao ribossomo em resposta ao primeiro código (AUG). O fator de iniciação IF1 por sua vez participa na interação entre IF2 e o iniciador tRNA. O fator IF2 pode ser fosforilado, o que fornece um mecanismo pelo qual a velocidade da síntese protéica possa ser regulada. O fator IF2 fosforilado pode ser regulado pelo cAMP (adenosina monofosfato cíclico).

Resumindo: (1) o amino acil-tRNA entra no sítio A; (2) forma-se a ligação peptídica com o alongamento da cadeia e saída do tRNA que estava ocupando o sítio P; (3) translocação do mRNA carregando a cadeia peptídica do sítio A para o sítio P, processo que coloca o próximo código em posição e (4) fim da síntese quando o peptidil-tRNA alcança o código de terminação. A regulação da expressão gênica ocorre principalmente em nível da transcrição, isto é, na passagem da informação genética do DNA para o RNA.

Durante os primeiros momentos do desenvolvimento pancreático, a diferenciação das células progenitoras em células das ilhotas que produzem hormônios é rigidamente regulada pela expressão sequencial de fatores de transcrição específicos. Pelo fato, dos fatores de transcrição desempenharem um papel importante no desenvolvimento pancreático, a regulação de sua expressão é importante para manter o desenvolvimento pancreático e a função das células beta [Cerf, Muller et al., 2005]. Dentro da região do promotor do gene da insulina, existem vários elementos de sequência distinta, chamados elementos A, C, E, Z e CRE, os quais determinam a localização da insulina nas células beta, bem como, servem de sítios de ligação para vários fatores de transcrição que regulam a expressão do gene da insulina [Hay, Docherty 2006]. O estudo dos genes de insetos, foi importante por fornecer valiosas informações para entendermos como os genes funcionam. Por exemplo, foram observados mutantes do desenvolvimento, isto é, mutações de genes que alteram um determinado segmento do corpo por outro segmento diferente. Essas mutações são chamadas mutações homeóticas. Mutações homeóticas referem-se as mutações que ocorrem nos genes de segmentação, aqueles que especificam o número correto dos segmentos do corpo embrionário. Por exemplo, uma mutação do gene *trithorax* da *Drosophila* causa transformações homeóticas no corpo do inseto. [Breen, Harte 1993]. Muitos dos genes implicados no desenvolvimento da *Drosophila* compartilham uma pequena região (180 nucleotídeos) da região de sequência homóloga, o qual foi denominado “*homeobox*” (*homeobox* porque foi primeiro descrito nos genes homeóticos). O termo *homeobox* refere-se a uma sequência de DNA conservada de mais ou menos 100 b.p (b.p.= pares de bases) que codifica um domínio (região) de proteína (*homeodomain*) que regula a diferenciação durante o desenvolvimento de um organismo. A descoberta do “*homeobox*” ou “*homeodomain*” como é também conhecido, cuja sequência é altamente conservada de tal forma, que ela pode ser usada como uma sonda para isolar genes que o contém. *Homeobox* contendo proteínas são proteínas ligadoras de DNA [Shepherd, McGinnis et al., 1984]. O promotor deve ser visto como um grande complexo formado pelas interações entre diferentes proteínas e o cromossomo, em equilíbrio dinâmico com forças atuando dentro e fora da célula [Ohneda, Hoo, German 2000]. O estudo das interações entre proteínas que ligam os elementos justapostos E e A no promotor do gene da insulina mostrou que sozinhos os elementos E e A não tem nenhuma atividade transcricional significativa nas células beta, porém juntos aumentam de forma dramática a atividade do promotor ligado [German, Moss et al., 1992; Karlsson, Walker et al., 1989].

PDX-1: Entre os vários fatores de transcrição implicados no desenvolvimento do pâncreas e maturação das células beta, destacamos o PDX-1 (*pancreatic duodenal homeobox factor-1*), também conhecido como IDX-1 (*islet and duodenal homeobox-1*), TF-1 (*somatostatin transactivating factor-1*) PF-1 (*insulin promoter factor-1*), IUF-1 (*insulin upstream factor-1*) e GSF (*glucose sensitive factor*) [Ohlsson, Karlsson, Edlund 1993; Kaneto, Matsuoka et al., 2008; Andrali, Sampley et al., 2008]. Durante o desenvolvimento do pâncreas, o PDX-1 desempenha

um duplo papel, contribui para a formação do pâncreas e regula a fisiologia celular das células das ilhotas, na célula madura [Ashizawa, Brunicardi, Wang 2004]. O PDX-1 apresenta um “*homeodomain*” altamente conservado, o qual adquire uma conformação “*helix-turn-helix*” (hélice-curva-hélice) com três segmentos alfa hélices, sendo o terceiro segmento helicoidal, o de reconhecimento do DNA [Hessabi, Ziegler et al., 1999]. Sozinho o PDX-1 é capaz de ativar a expressão da insulina endógena em células diferentes das células beta [Serup, Jensen et al., 1996]. Estudos sobre o mecanismo de ação do PDX-1 mostrou, que usando um RNA que interfere especificamente no PDX-1 diminuindo a ação do fator, havia uma redução dos níveis de pré-mRNA [Iype, Francis et al., 2005]. PDX-1 funciona em diferentes estágios do desenvolvimento das ilhotas. A inativação do PDX-1 resulta em agênese pancreática tanto em camundongos quanto em humanos [Jonsson, Carlsson et al., 1994; Offield, Jetton et al., 1996]. Perda do PDX-1 das células produtoras de insulina nos primórdios do desenvolvimento das células beta, conduz a uma perda gradual das células que expressam a insulina, início precoce do diabetes, quebra da arquitetura das ilhotas e um aumento do número de células expressando o glucagon às custas das células beta [Wilding, Gannon 2004]. A transcrição específica das células betas das ilhotas do gene da insulina é mediada através da ligação das ilhotas enriquecidas pelos fatores de transcrição PDX-1, BETA 2 e MaFA. O PDX-1 liga e ativa o elemento GG2 localizado entre os nucleotídeos -145 e -140 do gene humano, enquanto em sítios correspondentes, porém não idênticos em roedores, os genes de insulina são negativamente regulados pelo fator de transcrição Nkx2.2 [LeLay, Stein 2006]. Tendo em vista essa observação, os autores alertam para o fato de que apesar da percepção de que a desregulação da expressão gênica da insulina contribua para o diabetes, um enfoque desproporcional tem sido direcionado para usar o gene de roedores como modelo de transcrição de insulina de mamíferos [Le Lay, Stein et al., 2006]. Apesar do alerta desses autores, não há dúvida de que as pesquisas levadas a efeito em roedores trazem informações importantes para o conhecimento da insulina. O PDX-1 um homeodomain contendo fatores de transcrição, quando sofre mutação resulta uma forma de diabetes tipo 2 chamado MODY (*Maturity Onset Diabetes of Youngs*) [Stoffer, Ferrer et al., 1997; Dutta, Bonner-Weir et al., 1998; MacFarlane, Frayling et al., 1999]. O PDX-1 ativa a transcrição de muitos genes das células beta, implicadas na homeostase da glicose, incluindo a insulina, a enzima glicoquinase e o transportador de glicose o GLUT 2 [Waeber, Thompson et al., 1996; Cissell, Zhao et al., 2003]. Ele é ativado pela glicose através de uma via de sinalização dependente de insulina, que envolve o fosfatidilinositol 3 quinase, sendo que a estimulação desta via leva a fosforilação e ativação da forma citoplasmática do PDX-1 translocando-o para o núcleo [Macfarlane, McKinnon et al., 1999]. A expressão do PDX-1 é essencial nas células beta para manter a produção do hormônio, a expressão do transportador de glicose GLUT2 e a euglicemia [Ahlgren, Jonsson et al., 1988].

PAX-4 e PAX-6: O gene PAX-4 foi identificado primeiramente em camundongos e subsequentemente em humanos e ratos [Dohrman, Gruss, Lemaire 2000]. As proteínas Pax são caracterizadas pela presença de uma região ou domínio, altamente conservada, de ligação ao DNA constituída por 128 aminoácidos (região pareada) que faz contato específico com o DNA [Epstein, Cai et al., 1994]. Em mamíferos a família Pax é constituída de nove genes (Pax-1 a Pax-9), desempenhando um importante papel no desenvolvimento de vários órgãos e tecidos tais como timo (Pax-1 e Pax-7), vértebra (Pax-1), ouvido (Pax-2 e Pax-8), rins (Pax-2), sistema nervoso central (Pax-2, Pax-3, Pax-5, Pax-6 e Pax-7), pâncreas (Pax-4 e Pax-6) e tireóide (Pax-8) [Blake, Ziman 2014]. A função dos genes Pax é o de controlar o equilíbrio entre os processos de proliferação e diferenciação de células progenitoras. Acredita-se que o controle molecular desses dois processos seja o resultado da utilização de diferentes regiões de ligação ao DNA [Blake, Ziman 2014]. O Pax-4 pode estar implicado na expressão específica das células alfa do gene do glucagon e na diferenciação das células beta produtoras de insulina [Ritz-Laser, Streicher et al., 2002].

O pâncreas endócrino expressa o Pax-4, o qual desempenha um importante papel na geração das células beta, responsáveis pela produção de insulina durante o desenvolvimento embrionário e posteriormente durante o período adulto [Greenwood, Li et al., 2007; Sosa-Pineda, Chowdhury et al., 1997]. Estudos em animais apontam para o fato de que a falta de Pax provoca duas alterações paralelas: severa depleção de células β produtoras de insulina e células δ produtoras de somatostatina e uma significativa expansão de células α produtoras de glucagon e células ϵ produtoras de grelin [Prado, Pugh-Bernard et al., 2004; Sosa-Pineda, Chowdhury et al., 1997]. Embora o peptídeo grelin seja primariamente expresso nas células oxínticas (produtoras de ácidos) da mucosa do estômago é também orexigênico, isto é um estimulador do apetite. Em roedores e humanos, também são encontrados no pâncreas células que expressam o grelin [Broglia, Gottero et al., 2003; Prado, Pug-Bernard et al., 2004]. O Pax-4 atua na sobrevivência e regeneração das células beta do pâncreas, através da regulação coordenada da modulação imune, do ciclo celular, sobrevivência celular, homeostase do retículo endoplasmático e reparação do DNA [Mellado-Gil, Jimenez-Moreno et al., 2016]. O Pax-4 pode funcionar como um repressor transcricional no desenvolvimento do pâncreas, reprimindo a diferenciação das células α e permitindo a diferenciação das células β [Smith, Ee et al., 1999]. Em virtude do Pax-4 e Pax-6 apresentarem dois domínios de ligação ao DNA, uma região pareada e um *homeodomain*, tendo respectivamente 61, 3% e 69,5% de identidade de amino-ácidos, o Pax-4 é capaz de ligar com alta afinidade ao sítio alvo do Pax-6 competindo com este pelo promotor do gene do glucagon [Knepel, Vallejo et al., 1991; Kalousova, Benes et al., 1999]. O Pax-4 impede o desenvolvimento da hiperglicemia e protege as células beta contra a apoptose. O mecanismo dessa proteção pode estar ligado a regulação de genes alvo da sinalização do NFkB (*nuclear factor of activated B cells*) [Melloul 2008]. O NFkB é um importante fator de transcrição para a regulação da expressão de genes envolvidos em múltiplos tipos de respostas imune e inflamatórias. A apoptose ou morte programada de células é um modo fisiológico de remodelação tecidual durante a organogênese [Mandrup-Poulsen 2001]. A destruição das células β é parcialmente mediada por citocinas como IL-1 (interleucina-1), TNF α (tumor necrosis factor α), INF (interferon). IL-1 e TNF α são mediadores da via do fator de transcrição NFkB [Melloul 2008]. O Pax-6 é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso central e do pâncreas. Detectado nos progenitores pancreáticos concomitantemente com o início da expressão do hormônio, sua expressão persiste nas células endócrinas em desenvolvimento e no adulto [Ashery-Padan, Zhou et al., 2004]. Parece não haver dúvidas quanto a essencialidade no desenvolvimento endócrino normal, tanto do Pax-4 quanto ao Pax-6. Enquanto o Pax-4 se relaciona principalmente com a diferenciação das células β e δ , o Pax-6 tem sido associado com a formação das células α , organização dos tipos de células β [Ashery-Padan Zhou et al., 2004]. Estudos realizados em camundongos, mostraram que esses roedores sem o Pax-6 e Pax-4 não produzem nenhuma célula endócrina, sugerindo uma sobreposição nos papéis dos dois genes, na gênese das células endócrinas [St-Onge, Sosa-Pineda et al., 1997]. Por outro lado, a excessiva expressão do Pax-6 causa ativação significativa do promotor do gene da insulina, bem como, dos promotores dos genes do PDX-1 e do MaFA [Gosmain, Katz et al., 2012; Raum, Hunter et al., 2010]. A inibição da expressão do gene do Pax-6 afeta de forma significativa a biossíntese da insulina. Portanto, conclui-se que o Pax-6 é um regulador crucial da transcrição do gene da insulina por um efeito direto ou indireto sobre os fatores de transcrição PDX-1 e MaFA. Quantitativamente foi observado que a inibição de 75% na expressão do Pax-6 em células beta primárias resultou numa redução de 60% nos níveis do mRNA da insulina [Gosmain, Katz et al., 2012].

O Pax-6 interage com pelo menos dois elementos controle do promotor do DNA do gene do glucagon do rato, o G3 e o G1. O elemento G1 é o que confere especificidade às células α para expressarem o gene do glucagon [Ritz-Laser, Estreicher et al., 1999]. Tem sido relatado intolerância à glicose e predisposição ao diabetes em alguns indivíduos e em alguns animais com mutação heterozigótica do Pax-6 [Hamasaki, Yamada et al., 2007; Wen, Chen et al., 2009; Ding,

Gao et al., 2009]. Usando tamoxifeno (um composto anti-estrógeno e usado no tratamento do cancer de mama) para inibir a atividade do Pax-6 em camundongos adultos foi observado todos os sintomas de diabetes, o que sugere a essencialidade do Pax-6 para o adulto [Hart, Mella et al., 2013]. Por outro lado, o Pax-6 é necessário para a identidade das células beta pancreáticas, para a síntese de ATP regulada pela glicose e para a dinâmica de Ca^{2+} no camundongo adulto [Mitchell, Nguyen-Tu et al., 2017].

MaFA: A família MaF de fatores de transcrição é um subgrupo das famílias de “leucina zíper” (bzip) básica. As proteínas MaFA são homólogas das oncoproteínas virais identificadas como um elemento transformante no genoma do retrovírus do sarcoma do músculo aponeurótico das galinhas [Nishizawa, Kataoka et al., 1989]. Os membros da família bzip contém uma região extensa de homologia altamente conservada ou região de ligação ao DNA auxiliar, além de uma região básica típica e ambas as regiões estão envolvidas no reconhecimento da sequência do DNA alvo [Aramata, Han, Kataoka 2007]. Os membros da família de proteínas MaF são subdivididos em dois grupos: proteínas MaF grandes e proteínas MaF pequenas. O MaFA pertence ao grupo de proteínas grandes. O fator de transcrição RIPE3b1, que se liga ao elemento RIPE2b do promotor do gene foi identificado como um fator de mamífero (mMaFA) homólogo ao MaFA de aves [Olbro, Rud et al., 2002; Kajihara, Sone et al., 2003; Kataoka, Han et al., 2002]. Embora o fator V-Maf tenha sido identificado como uma proteína transformante retroviral, hoje é aceito, que a família de proteínas MaF atua como reguladores de uma grande variedade de células e na expressão do gene específico do tecido, bem como, também desempenha um papel na diferenciação celular durante o desenvolvimento. O fator de transcrição MaFA controla a expressão de células beta do gene da insulina é expressa somente nas células β e funciona como um potente ativador da transcrição do gene da insulina [Zhang, Moriguchi et al., 2005]. Camundongos deficientes desse fator (MaFA), mostraram intolerância à glicose e desenvolvimento de diabetes, em razão da redução na transcrição de insulina, redução da secreção do hormônio, reduzido número de células β e alteração na arquitetura das ilhotas [Zhang, Moriguchi et al., 2005; Matsuoka et al., 2004]. Além de sua ação na expressão de insulina o MaFA desempenha um papel, também na expressão de outros genes como adinoptina, GLUT2, Nkx6.1 (NK homeobox 1), PDX-1, piruvato carboxilase, e pró-hormônio convertase 1/3 [Tsuchiya, Yoshida et al., 2007; Wang, Brun et al., 2007; Zhang, Moriguchi et al., 2005; Samaras, Zhao et al., 2003; Nomura, Nakamura et al., 2006].

Nkx 2.2 e Nkx 6.1: As proteínas NKx *homeobox* constituem uma família de fatores de transcrição de desenvolvimento, que possuem uma região de ligação ao DNA e cuja sequência de aminoácidos é conservada entre os membros da família [Li, Itou et al., 2016]. Membros da subfamília Nkx-2 são reguladores do desenvolvimento e diferenciação de vários tecidos: Nkx 2.1 é necessário para o desenvolvimento dos pulmões e tireóide; Nkx 2.5 é necessário para a formação do coração [Kimura, Hara et al., 1996; Lints, Parsons et al., 1993]. No início da formação das ilhotas pancreáticas o Nkx 2.2 é expresso em todas as células, porém com o desenvolvimento do processo de maturação, a expressão desse fator de transcrição fica restrito as células α , β e PP. A falta do gene Nkx 2.2, causa diabetes pelo acúmulo de células β incompletamente diferenciadas, as quais expressam alguns marcadores de células β , mas não a insulina [Sussel, Kalamares et al., 1998]. O mRNA do gene Nkx 2.2 é encontrado nas ilhotas pancreáticas adultas e na linhagem de células α e β ; por sua vez o Nkx-6.1 é expresso nas células β adultas e na linhagem de células α e β [Rudnick, Ling et al., 1994; Jensen, Serup et al., 1996]. No insulinoma, há uma co-ativação seletiva da proteína *homeodomain* Nkx-6.1 com a insulina, o que sugere que o fator Nkx 6.1 desempenha um papel na especificação das células β normais, fato que é consubstanciado pelo achado do confinamento desse fator exclusivamente dentro do núcleo das células β pancreáticas [Jensen, Serup et al., 1996]. Alteração do gene Nkx 6.1 em camundongos resulta na inibição da formação da célula β [Sander, Griffen et al., 1998]. O fator de transcrição

Nkx 6.1 é indispensável para a maturação e intensificação da proliferação de células β durante o estágio de transição secundária do desenvolvimento pancreático, isto é o estágio de proliferação de futura células [Sander, Sussel et al., 2000]. O fator de transcrição Nkx 6.1 é também responsável pela intensificação da expressão do fator c-Fos. Este fator c-Fos é um gene regulado em resposta a vários sinais celulares e estresse. C-Fos está envolvido na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular [Ray, Kener et al., 2016].

GLUCAGON

Em 1922, Kimbal e Murlin identificaram uma fração pancreática responsável pelo aumento da concentração de glicose sanguínea, quando administrada a coelhos e cães. A partir desse achado, concluíram que o pâncreas produzia um fator específico, que se opunha ao efeito hipoglicêmico da insulina e o denominaram “*The GLUCose AGONist* ou glucagon [Muller, Finan et al., 2017; Kimbal, Murlin 1923]. Mais tarde, foi verificado que o efeito hiperglicemiante dessa substância (glucagon) se devia ao seu efeito glicogenolítico, o que levou a uma reclassificação do glucagon como fator glicogenolítico hiperglicemiante, HF (*Hyperglycemic-glyconolytic fator*) [Burger, Brandt 1935; Burger, Kramer 1929; Muller, Finan et al., 2017]. Na década de 1950 o glucagon foi purificado e cristalizado e sua sequência de aminoácidos determinada [Staub, Sinn, Behrens 1953; Bromer, Sinn et al., 1957]. O glucagon é um hormônio peptídico constituído de 29 resíduos de aminoácidos, apresentando uma estrutura primária altamente conservada em mamíferos, secretado pelas células alfa das ilhotas pancreáticas (Figura 3.4). É sintetizado sob a forma de um precursor, o proglucagon, uma proteína constituída por 180 resíduos de amino ácidos [Bell, Sanchez-Pescador et al., 1983]. O gene proglucagon é expresso no pâncreas, intestino e cérebro, com produção de um único transcrito mRNA do proglucagon, que é idêntico em todos os tecidos.

Figura 3.4 - Sequência primária do glucagon com abreviaturas de três letras e uma única letra

Abreviatura de 3 letras:

H3N-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COO-

Abreviatura de uma letra:

H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-M-N-T

O proglucagon de mamíferos é constituído por 180 resíduos de aminoácidos e apresenta no seu interior uma sequência de glucagon. Além de conter uma sequência de glucagon, o proglucagon de mamíferos contém também uma sequência de glicentina, dois polipeptídeos semelhantes ao glucagon o 1 e o 2 (GLP-1 e GLP-2). O glucagon é codificado pelo proglucagon, uma proteína de 160 amino ácidos (a.a.), que é derivada do gene preproglucagon. O proglucagon dá origem a uma série de hormônios peptídicos, que inclui a glicentina (aminoácidos:1-69), polipeptídeo relacionado a glicentina, GRPP aminoácidos:1-30), oxintomodulina (OXM) (aminoácidos:33-69) e GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) (aminoácidos: 72-108) e GLP-2 (aminoácidos:126-158) [Drucker 1990; Mojsov, Heinrich et al., 1986]. Isolada do intestino de porco, a glicentina um peptídeo de 69 resíduos de aminoácidos mostrou conter em seu interior uma sequência do glucagon do pâncreas [Thim, Moody 1981]. O glucagon pertence a uma família de peptídeos estruturalmente relacionados, que inclui a secretina [Mutt, Jorpes, Magnusson 1970; Thim, Moody 1981], o peptídeo inibidor gástrico [Brown, Dryburgh 1971], peptídeo vaso intestinal [Mutt, Said 1974] e fator liberador do hormônio do crescimento [Spiess, Rivier et al., 1982]. O

glucagon e os peptídeos semelhantes ao glucagon (GLP-1 e GLP-2), são codificados pelo gene proglucagon e apresentam funções essenciais, porém diferentes no metabolismo [Jiang, Zhang 2003; Drucker 2002; Kieffer, Habener 1999].

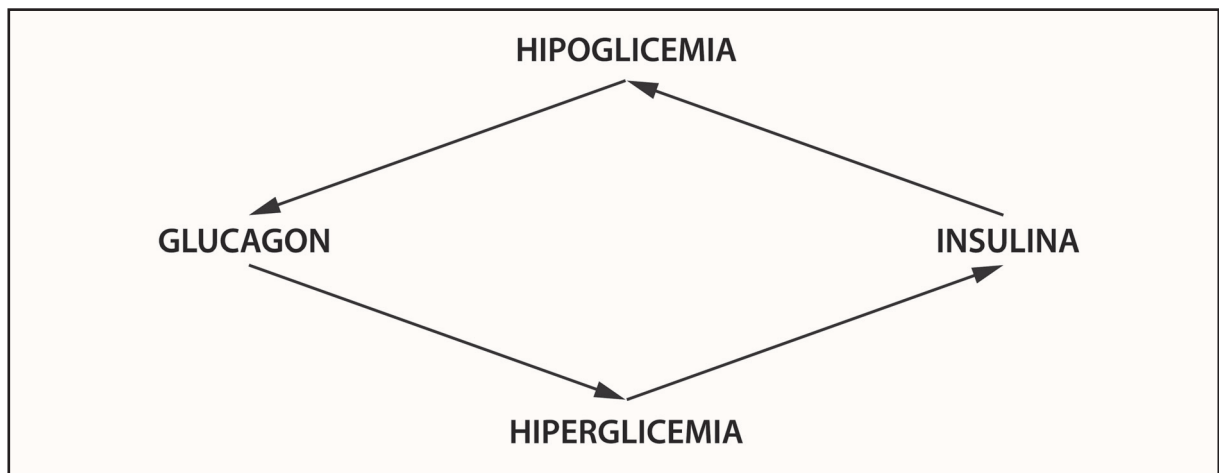
O glucagon é um importante hormônio regulador do metabolismo de carboidratos, lipídeos e amino ácidos, que atua como contraregulador do hormônio insulina na regulação da glicose do sangue [Nian, Drucker, Irwin 1999], ao atuar na produção de glucose pela gliconeogênese e glicogenólise hepática [Sinclair, Druckr 2005]. O GLP-1 é um hormônio incretina, contendo 36 aminoácidos e o C terminal na forma amídica, secretado pelas células L-intestinais, em resposta a ingestão de alimentos e potencializa a liberação de insulina das células beta do pâncreas, bem como, desempenha um papel no esvaziamento gástrico [Drucker 1998], que se torna ativo ao se ligar ao receptor cognato. Seu papel é o de abaixar os níveis de glicose circulante, pelo estímulo da secreção de insulina e inibição da secreção de glucagon [Kreymann, Williams et al., 1987; Willms, Werner et al. 1996]. O termo incretina foi dado pelo pesquisador La Barre, quando a partir de extratos intestinais isolou e purificou um composto capaz de abaixar a glicemia, ao qual denominou incretina (*INtestine seCRETion INsulin*) [Zunz, La Barre 1929; Yabe, Seino 2011]. O GLP-2, por sua vez, é um peptídeo que estimula o transporte intestinal de hexose e é trófico para o epitélio da mucosa intestinal [Drucker 1997].

Tanto a expressão quanto a secreção de GLP-1 e GLP-2 do gene proglucagon são regulados pela via dependente de cAMP [Drucker, Brubaker 1989]. Nas ilhotas pancreáticas o GLP-1 atua aumentando a proliferação e diferenciação, a biossíntese e secreção de insulina e diminui a apoptose; no fígado diminui a produção de glicose, a lipogênese e a esteatose; no músculo aumenta a sensibilidade a insulina e a captação de glicose; no coração aumenta a proteção e função, aumenta a proteção dos vasos e diminui a inflamação [Lee, Jun 2014]. O GLP-1 estimula a enzima adenilato ciclase (que atua no ATP produzindo cAMP) com ativação subsequente da proteína quinase A (PKA), e a proteína quinase C (PKC), causando um aumento do cálcio citossólico em linhagens de células de ilhotas e não ilhotas [Drucker, Philippe et al., 1987].

O polipeptídeo pancreático do rato relacionado a glicentina (GRPP) não afeta a produção de glicose, porém provoca uma forte inibição da secreção de insulina estimulada pela glicose no pâncreas do animal [Whiting, Stewart et al., 2015], sugerindo um papel fisiológico desse polipeptídeo na regulação da secreção de insulina. O processamento do proglucagon no pâncreas é diferente do processamento nas células intestinais. No pâncreas, o proglucagon é convertido pelo prohormônio convertase a glucagon, enquanto nas células L da mucosa intestinal a sequência do glucagon faz parte da glicentina e oxintomodulina [Holst 2002]. A secreção do glucagon desempenha importante papel na patogênese do diabetes tipo 2, que é caracterizado por hiperglucogonemia relativa ou absoluta no estado de jejum e posprandial [Toft-Nielsen, Damholt et al., 2001]. Os hormônios incretínicos, o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), os quais são liberados pós-prandial, tem ações opostas na secreção do glucagon [Holst, Vilsboll, Deacon 2009]. O GLP-1 é um potente inibidor da secreção do glucagon e retém essa capacidade, também em pacientes diabéticos tipo 2 [Vilsboll, Krarup et al., 2002]. Por outro lado, tanto o GLP-2 quanto o GIP são estimulantes da secreção do glucagon [Méier, Nauck et al., 2006; Meier, Galwitz et al., 2003]. O GIP, polipeptídeo insulínico dependente de insulina, é um polipeptídeo de 42 amino ácidos, secretado pelo duodeno e jejuno [Inagaki, Seino et al., 1989], identificado, inicialmente com base na sua inibição da secreção gástrica (*the gastric inhibitory polypeptide*) GIP. Como uma incretina, o GIP favorece a secreção de insulina estimulada pela glicose e indiretamente modula a secreção de glucagon [Finan, Muller et al., 2016]. Em humanos saudáveis, o GIP suprime a secreção de glucagon sob condições de hiperglicemia, porém aumenta a secreção de glucagon durante hipoglicemia ou euglicemia [Christensen, Vedtofte et al., 2011; Meier, Gallwitz et al., 2003].

O fato do polipeptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) inibir a secreção do glucagon levou os pesquisadores a estudar análogos do GLP-1, bem como, procurar inibidores da enzima inibidora da degradação do GLP-1, a peptidase-4 (DPP-4), para serem usados no tratamento do diabetes tipo 2 [Kalra, Baruah et al., 2016; Mize, Salehi 2013]. O mecanismo de ação de análogos de GLP-1 é o de aumentar a sensibilidade das células beta para glicose, intensificando dessa maneira, a secreção de insulina induzida pela glicose e ao mesmo tempo inibir a secreção de glucagon das células alfa [Holst, 2007]. O controle da secreção do glucagon pelas células alfa do pâncreas é similar aquele da secreção de insulina pelas células beta. A figura 3.5 mostra as relações entre as atuações de glucagon e insulina.

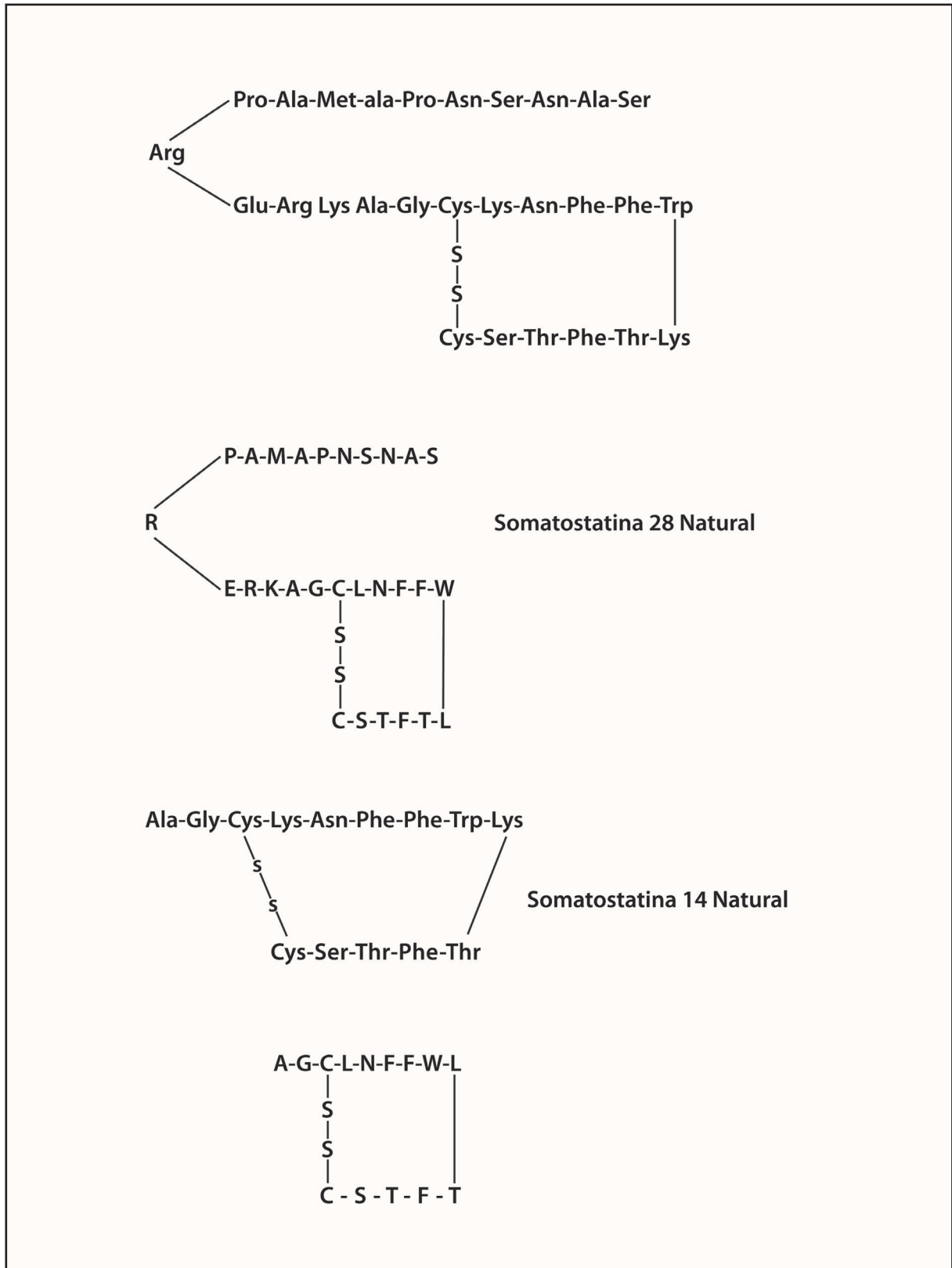
Figura 3.5 - Controle da secreção de glucagon e da insulina



SOMATOSTATINA

A somatostatina é um hormônio peptídico isolado pela primeira vez do hipotálamo, com atividade inibidora da liberação do hormônio do crescimento. Isolado, caracterizado e reproduzido por síntese esse hormônio tetradecapeptídeo [Brazeau, Vale et al., 1973; Burgus, Liang et al., 1973; Guillemin, Gerich JE 1976]. Após seu isolamento e purificação, sua estrutura foi descrita como constituída por 14 resíduos de aminoácidos tendo uma ponte dissulfeto, uma sequência, também encontrada em outros vertebrados e no pâncreas de rato [Vale, Ling et al., 1976; Benoit, Bohlen et al., R 1980]. A somatostatina é um hormônio encontrado nos neurônios hipotalâmicos, nas células δ das ilhotas do pâncreas e células D da mucosa intestinal [Elde, Parsons 1975; Polak, Pearse et al., 1975]. A somatostatina é sintetizada como um precursor contendo 116 resíduos de aminoácidos, a preprosomatostatina, que é convertida a prosomatostatina uma proteína de 96 resíduos de aminoácidos que por sua vez é transformada em dois peptídeos bioativos, um predominante, cuja molécula é constituída por 14 resíduos de aminoácidos (somatostatina 14) e outra molécula contendo 28 resíduos de aminoácidos (somatostaina 28) [Reisine, Bell 1995]. De um modo geral a somatostatina é um hormônio parácrino, isto é, seus efeitos são locais, sendo rapidamente inativada por endopeptidases [Roosterman, Kempes et al., 2008]. Sendo uma molécula contendo apenas 14 resíduos de amino ácidos e considerando sua utilidade como agente farmacoterápico, a atenção dos pesquisadores se voltou para a síntese de análogos mais estáveis e mais potentes que o hormônio (cuja vida média é de apenas 1 minuto) e que apresentasse eficácia [Vale, Rivier et al., 1978; Modlin, Pavel et al., 2010]. Estudos sobre a relação estrutura/ atividade revelaram que os resíduos Phe, Trp, Lys e Thr situados na curva da estrutura são necessários para a atividade biológica (Figura 3.6).

Figure 3.6 - Estrutura primária da somatostatina 14 e 28 e de análogos



A introdução do amino ácido D-Phe (não natural) na extremidade N terminal, do amino ácido L-Thr no C terminal e a substituição do L-Trp pelo D-Trp na posição 8 tornou o peptídeo mais resistente a degradação [Harris 1994].

A somatostatina atua através de cinco receptores distintos (SSTR 1 a 5) [Brazeau, Vale et al., 1973; Reisine, Bell 1995; Gillies 1997]. O receptor SSTR 5 tem um importante papel na regulação da secreção dos hormônios pancreáticos, via ligação com a somatostatina [Rutter 2009; Csaba, Pineau, Dournaud 2012; Piguera, Martinez 2004]. A liberação da somatostatina das células δ é controlada de forma similar àquela da insulina, porém, com a diferença de que a secreção de somatostatina é substancialmente estimulada por concentrações baixas de glicose (3 mM) [Vieira, Salehi, Gilfe 2007]. A somatostatina apresenta um importante papel parácrino intrailhotas das células δ na regulação da secreção dos hormônios das ilhotas. A somatostatina intrailhotas exerce efeito inibidor tônico sobre a secreção induzida de insulina e glucagon que pode ser importante em regular respostas do receptor estimulado [Hauge-Evans, King et al., 2009].

AMILINA

A ocorrência de agregados amiloides nas ilhotas pancreáticas de indivíduos com diabetes tipo 2, era uma observação muito freqüente [Erich, Ratner 1961]. A análise do agregado amiloide encontrado no pâncreas mostrou ser composto principalmente por um polipeptídeo, contendo 37 resíduos de aminoácidos [Cooper, Willis et al., 1987; Westermark, Wernstedt et al., 1987], sendo denominado peptídeo associado a diabetes ou peptídeo amiloide das ilhotas (*islet amyloid peptide*) IAPP [Cooper, Willis et al., 1987; Westermark, Engstrom et al., 1987]. Esse peptídeo apresenta efeito metabólico fora do pâncreas, sendo então, reconhecido como um hormônio e redefinido como amilina [Betsholtz, Johnason, Westermark 1989; Cooper, Leighton et al., 1988].

A amilina (Figura 3.7) é inicialmente expressa como parte de uma preproteína de 89 resíduos de aminoácidos (preproamilina), contendo um peptídeo sinal de 22 resíduos de aminoácidos [Sanke, Bell et al., 1988; Nishi, Chan et al., 1989; Mosselman, Hoppener et al., 1989].

Figura 3.7 - Sequência primária da amilina com abreviaturas de 3 e 1 letra

Abreviatura de 3 letras:

H2N-Iys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser-Thr-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr

Abreviatura de uma letra:

K-C-N-T-A-T-C-A-T-Q-R-L-A-N-F-L-V-H-S-S-N-N-F-G-A-I-L-S-S-T-N-V-G-S-N-T-Y

Quando se comparou a amilina humana com a amilina de roedores constatou se, que a humana formava fibrilas amilóide, enquanto a de roedores não formava. Há evidências de que os resíduos de 20 a 29 amino ácidos da amilina humana são as responsáveis pela formação de fibrilas amilóide [Betsholtz, Cristmansson et al., 1989; Westermark, Engstrom et al., 1990].

A amilina é um membro da família da calcitonina, que inclui a calcitonina (CT), a α -CGRP (α -cacitonin gene related peptide), a β -CGRP, a adrenomedulina (AM) a AM2 (também conhecida como intermedina). Os membros desta família apresentam uma ligação dissulfeto (-S-S-) no N-terminal (extremidade do grupo amínico livre) e um C-terminal (grupo carboxílico livre) na forma de amida (-CONH₂). Receptores de calcitonina (CTR) e receptores semelhantes a CTR, são receptores para membros dessa família [Kiriya, Nochi 2018; Hay, Gareja et al., 2018]. Vamos lembrar que a calcitonina é um hormônio peptídico, contendo 37 resíduos de aminoácidos, sintetizado na tireóide e implicado no metabolismo do cálcio. Ele reduz o cálcio sérico inibindo a reabsorção de cálcio de ossos e rins.

As células betas do pâncreas são as principais fontes de amilina circulante. A contribuição de outras células secretoras de amilina é considerado mínimo, de modo que, flutuações no sangue refletem alterações na secreção das células beta do pâncreas, bem como, flutuações na secreção pelas células beta, posprandial são as bases fisiológicas do efeito da amilina na homeostasia da saciedade e energia [Young, Denaro 1998]. A administração crônica de amilina reduz a adiposidade corporal, e esse efeito está associado com o aumento da oxidação de lipídeos, fornecendo energia para o aumento do gasto energético [Isakson, Wang et al., 2005].

Experimentos em animais sugerem que a leptina e amilina, bem como, a insulina e leptina interagem funcionalmente no controle da ingestão de alimentos [Osto, Wielinga et al., 2007; Rushing, Lutz et al., 2000]. A leptina é um hormônio, constituído de 136 aminoácidos secretado pelos adipócitos e que atua através de receptor de membrana, que é relacionada em estrutura e mecanismo de ação ao receptor do hormônio do crescimento. A amilina inibe a ingestão de alimentos e retarda o esvaziamento gástrico, levando a uma redução dos níveis de glicose do sangue e peso corporal. A amilina, bem como a insulina, desempenha importante papel no controle dos níveis glicêmicos. A administração periférica de amilina reduz a ingestão de alimentos, passa pela barreira sangue/cérebro alcançando os sítios de ligação, largamente distribuídos no sistema nervoso central [Lutz, Del Prete, Scharrer 1994; Banks, Kastin et al., 1995; Sexton, Paxinos et al., 1994]. A amilina reduzindo o tempo de esvaziamento gástrico reduz a entrega de nutrientes do estômago para o intestino, o que proporciona uma entrada menor de glicose para o sangue. Dessa forma, a amilina controla a glicemia reduzindo o nível de glicose do sangue posprandial [Kiriya, Nishi 2018]. As ações da amilina são mediadas por receptor de membrana, os quais estão presentes no sistema nervoso central, onde presume-se serem os sítios primários para a ação desse hormônio [Potes, Lutz 2010]. Após a ativação do receptor de amilina, vários sistemas de sinalização intracelular são ativados. Especificamente, a amilina aumenta a expressão do segundo mensageiro cGMP (guanosina monofosfato cíclico) na área postrema dos neurônios inativados [Riedger, Schmid et al., 2001], levando a fosforilação do ERK (*extracellular signal regulated kinase*) [Potes, Boyle et al., 2012]. O ERK $\frac{1}{2}$ pertence a família MAPK (*mitogen activated protein kinase*). O MAP é altamente conservado e está implicado em várias funções celulares, incluindo proliferação e diferenciação celular. A via MAP controla a proliferação e diferenciação celular, principalmente via regulação de fatores de transcrição, e para isso deve ser translocada do citosol para o núcleo [Nishimoto, Nishida 2006].

GRELINA

A grelina (*ghrelin*) é um peptídeo acilado (no resíduo serina), consistindo de 28 aminoácidos, identificado primeiramente no estômago humano e de rato, como um potente estimulador da liberação do hormônio de crescimento [Kojima, Hosoda et al., 1999; Yada, Damdindorj et al., 2014] (Figura 3.8).

Figura 3.8 - Sequência primária da grelina (*ghrelin*)

Abreviatura de 3 letras:

H2N-Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys--Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys Leu-Gln-Pro-Arg-COOH

Abreviatura de uma letra:

H2N-G-S-S- F-L-S-P-E-H-Q-R-U-Q-Q-R-K-E-S-K-K-P-P-A-K-L-Q-P-R-COOH

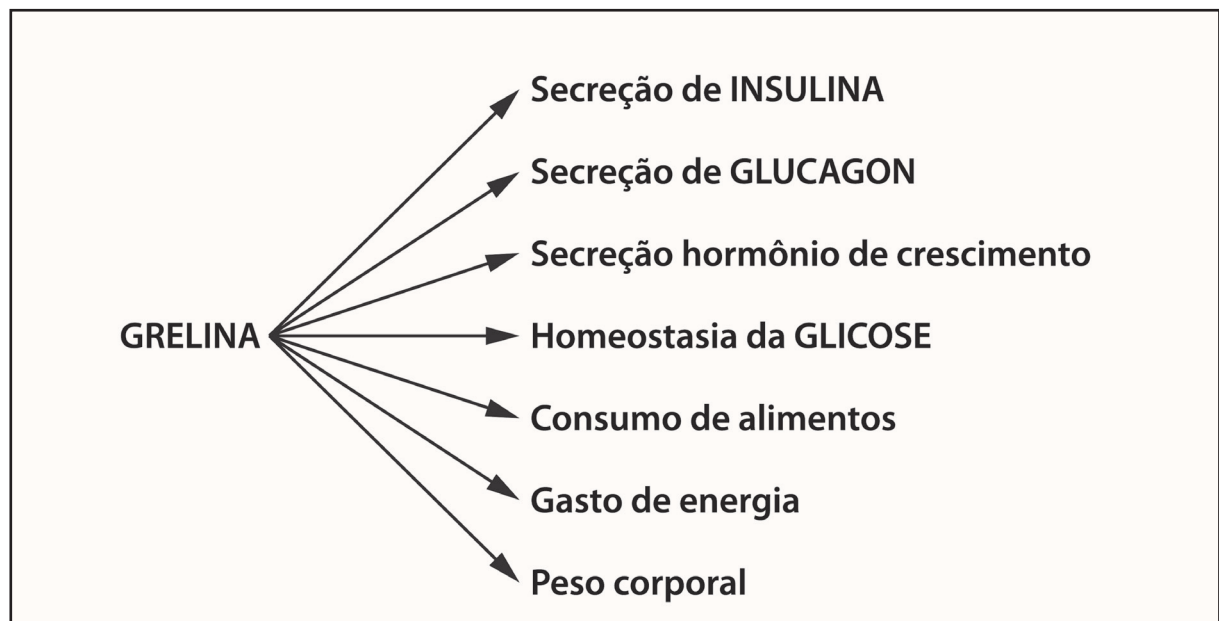
Em 2002, as células épsilon foram identificadas no pâncreas humano [Wierup, Svensson et al., 2002], produzindo o hormônio grelina. A grelina pode ser acilada ou não acilada. A acilação

é essencial para se ligar ao receptor do hormônio de crescimento (este receptor não liga a grelina não acilada). A acilação é alcançada pela enzima grelina-O-acil transferase [Gutierrez, Solenberger et al., 2008; Yang, Brown et al., 2008].

As primeiras evidências do efeito da grelina (*ghrelin*) sobre a glicose sanguínea vem de estudos em humanos que mostraram que a administração de grelina aumentava a glicose sanguínea [Broglia, Arvat et al., 2001]. Os efeitos induzidos pela grelina sobre a glicose sanguínea são mediados via alterações em múltiplos processos como redução da sensibilidade a insulina, efeito direto sobre as ilhotas pancreáticas endócrinas, como por exemplo, a supressão da secreção de insulina pelas células beta, modulação da secreção de glucagon pelas células alfa e estimulação da secreção de somatostatina pelas células delta pancreáticas [Mani, Shankar, Zigman 2019]. O mecanismo pelo qual a grelina suprime a secreção de insulina inclui um efeito direto sobre as ilhotas pancreáticas, sugerindo isso que a ação da grelina é dependente da expressão do receptor secretagogo do hormônio de crescimento (*GHSR = Growth Hormone Secretagogue Receptor*) [Kurashina, Dezaki et al., 2015].

Estudos em humanos avaliaram os efeitos da grelina (Figura 3.9) sobre a secreção do hormônio de crescimento, consumo de alimento, peso corporal, gasto de energia, homeostase da glicose [Takaya, Ariyasu et al., 2000; Druce, Wren et al., 2005].

Figura 3.9 - Resumo das ações da grelina



BIBLIOGRAFIA GERAL

Devlin TM (editor) Textbook of Biochemistry: clinical correlations. 7th edition. 2010. John Wiley & Sons, New Jersey, USA

Fox SW, Foster JF (editors) Introduction to Protein Chemistry. 1957 John Wiley & Sons. New jersey, USA

Steiner DF 2011. Adventures with insulin in the islets of Langerhans. *J Biol Chem* 286: 17399-421.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (editors) *Biochemistry* 5th edition 2002. W. H. Freeman and Company. New York, USA

Voet D, Voet JG. (editors). *Biochemistry*. 2th edition. 1995. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Ahlgren U, Jonsson L, Simu K, Edlund H 1988. Beta cell specific inactivation of the mouse IPF-1/ PDX-1 gene results in loss of the beta cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12: 1763-8.

Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL, Ozcan S 2008. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta cells. *Biochem J* 415: 1-10.

Aramata S, Han SI, Kataoka K 2007. Roles and regulation of transcription factor MaFA in islet cells. *Endocrine J* 54: 659-66.

Ashery-Padan R, Zhou X, Marquardt T et al., 2004. Conditional inactivation of Pax-6 in the pâncreas causes early onset of diabetes. *Dev Biol* 269: 479- 88.

Ashizawa S, Brunicardi FC, Wang XP 2004. PDX-1 and the pâncreas. *Pâncreas* 28: 109-20.

Banks WA, Kastin AJ, Maness LM, Huang W, Jaspan JB 1995. Permeability of the blood brain barrier to amylin. *Life Sci* 57: 1993-2001.

Banting FG, Best CH, Collip JB et al., 1922. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can Med Assoc J.* 12: 141-6.

Barron M 1920. The relation of the islets of Langerhans with special reference to cases of pancreatic lithiasis. *Surg Gynecol Obstr* 31: 437-48.

Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC 1983. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Can Med Ass J* 12: 141-6.

Benoit R, Bohlen P, Brazeau P, Ling N, Guillemin R 1980. Isolation and characterization of rat pancreatic somatostatin. *Endocrinol* 107: 2127-9.

Betsholtz C, Johnson KH, Westermark P 1989. Amylin hormone. *Nature* 338: 211.

Betsholtz C, Cristmansson L, Engstrom U et al., 1989. Sequence divergence in a specific region of the islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS Lett* 251: 261-4.

Blake JA, Ziman MR 2014. Pax genes regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development* 141: 737-51.

Bliss M 1993. Rewriting medical history: Charles Best and the Banting and Banting mith. *J Hist Med Allied Sci* 48: 253-74.

Brandenburg D 2008. History and diagnostic significance of C peptide. *Exp Diabet Res* 576862: 7. 10. 1155/ 2008.

Brazeau P, Vale W, Burgus S et al., 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-9.

Breen TR, Harte PJ 1993. Trithorax regulates multiple homeotic genes in the bithorax and antennapedia complexes and exerts different tissue specific, parasegment specific and promoter specific on each. *Development* 117: 119-34.

Broglio F, Arvat E, Benso A et al., 2001. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocr Metab* 86: 5083-6.

Broglio F, Gottero C, Benso A et al., 2003. Ghrelin and endocrine pancreas. *Endocrine* 22: 19-24.

Bromer WW, Sinn LG, Staub A, Behrens OK 1957. The amino acid sequence of glucagon. *Diabetes* 6: 234-8.

Brown JC, Dryburgh JR 1971. A gastric inhibitory polypeptide II. The complete amino acid sequence. *Can J Biochem* 49: 867- 73.

Burger M, Brandt W 1935. Über das glukagon (die hyperglykamisierende substanz der pankreas. *Z Ges Exp Med* 96: 375.

Burger M, Kramer H 1929. Über den hepatischen angriffspunkt des insulins. Die primäre paradoxe insulinhyperglykämie. *Z Ges Exp Med* 65: 487.

Burgus R, Ling N, Butcher M, Guillemin R 1973. Primary structure of somatostatin a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 70 684-8.

Cerf ME, Muller CJF, Du Toit DF et al., 2005. Transcription factors, pancreatic development and beta cell maintenance. *Biochem Biophys Res Commu* 326: 699-702.

Christensen M, Vedtofte L, Holst JJ et al., 2011. Glucose dependent insulinotropic polypeptide: a bifunctional glucose-dependent regulation of glucagon and insulin secretion in humans. *Diabetes* 60: 3130-9.

Cissel MA, Zhao L, Sussell L, Henderson E, Stein R 2003. Transcriptional factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by Nkx2.2. *J Biol Chem* 278: 751-6.

Cooper GJ, Willis AC, Clark A et al., 1987. Purification and characterization of a peptide from amyloid rich pancreas of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8628-32.

Cooper GJ, Leighton B, Drimitriades GD et al., 1988. Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* 85: 7763-6.

Csaba D, Pineau S, Dournaud P 2012. Molecular mechanisms of somatostatin receptor trafficking. *J Mol Endocrinol* 48: R 1-12.

Davis SN, Granner DK 1995. Insulin, hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Rudon RW (editors). 9th edition McGraw–Hill, Health Professions Division, New York, USA p. 1487-1517.

Ding J, Gao Y, Zhao J et al., 2009. Pax-6 haploinsufficiency causes abnormal metabolic homeostasis by down-regulating glucagon like peptide 1 in mice. *Endocrinol* 150: 2136- 44.

Dohrman C, Gruss P, Lemaire L 2000. Pax genes and the differentiation of hormones producing endocrine cells in the pancreas. *Mech Dev* 92:47-54.

Druce MR, Wn Am, Park AJ et al., Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obesity* 29: 1130-6.

Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF 1987. Glucagon like peptide-1 stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in the islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3434- 8.

Drucker DJ, Brubaker PL 1989. Proglucagon gene expression is regulated by cyclic AMP dependent pathway in rat intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3953-7.

Drucker DJ 1990. Glucagon and glucagon-like peptides. *Pancreas* 5: 484-8.

Drucker DJ, 1997 Intestinal growth factors. *Am J Physiol* 273 (Gastroint Liver Physiol 36): G 3-6.

Drucker DJ 1998. The glucagon like peptides. *Diabetes* 47: 159- 69.

Drucker DJ 2002. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon like peptides. *Gastroenterology* 122: 531- 44.

Dutta S, Bonner-Weir S, Montminy M, Wright C 1998. Regulatory factor linked to lat onset diabetes. *Nature* 392: 560.

Eknoyan G, Nagy J 2005. A history of diabetes mellitus or how a disease of kidneys evolved into kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 12: 223-9.

Elde RP, Parsons JA 1975. Immunocytochemical localization of somatostatin in cell bodies of the rat hypothalamus. *Ann J Anat* 144: 541-8.

Epstein J, Cai J, Glaser T, Jepeal M, Maas R 1994. Identification of a Pax paired domain recognition sequences and evidence for DNA dependent conformational changes. *J Biol Chem* 269: 8355- 61.

Erlich JC, Rattner IM 1961. Amyloidosis of the islets of Langerhans. A study of islet hyalin in diabetic and non diabetic individuals. *Am J Pathol* 38: 49-59.

- Finan B, Muller TD, Clemmensen C et al., 2016. Reappraisal of GIP pharmacology for metabolic diseases. *Trends Mol Med* 22: 359-76.
- German MS, Moss LG, Wang WJ 1992. The insulin and islet amyloid polypeptide genes contain similar cell-specific complexes. *Mol Cell Biol* 12: 1777-88.
- Gillies G 1997. Somatostatin: the neuroendocrine story. *Trends Pharmacol Rev* 18: 87-95.
- Gosmain Y, Katz LS, Masson MH et al., 2012. Pax-6 is crucial for beta cell function, insulin biosynthesis and glucose induced insulin secretion. *Mol Endocrinol* 26: 696- 709.
- Greenwood AL, Li S, Jones K, Melton DA 2007. Notch signaling reveals developmental plasticity of Pax-4 (+) pancreatic endocrine progenitors and shunts them to adult fate, *Mech Dev* 124: 97-107.
- Guillemin R, Gerich JE 1976. Somatostatin: physiological and clinical significance. *Annu Rev Med* 27: 379-88.
- Gutierrez JA, Solenberger PJ, Perkins DR et al., 2008. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 6320-5.
- Hamasaki A, Yamada Y, Kurose T et al., 2007. Adult pancreatic islets require differential Pax-6 gene dosage. *Biochem Biophys Res Commun* 353:40-6.
- Harris AG 1994. Somatostatin and somatostatin analogues: Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects. *Gut* 3 (supl): S 1-4.
- Hart AW, Mella S, Mendrychowski J, va-Heiningen V, Kleinjan DA 2013. The developmental regulator Pax-6 is essential for maintenance of islet cell function in adult mouse pancreas. *PLoS One* 8 (1): e54173 DOI: 10.1371.
- Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D et al., 2009. Somatostatin secreted by islet d cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58: 403- 11.
- Hay CW, Docherty K 2006. Comparative analysis of insulin gene promoters: implication for diabetes research. *Diabetes* 55: 3201-13.
- Hay DL, Garelja ML, Poyner DR, Walker CS 2018 Update on the pharmacology of calcitonin / CGRP family of peptides. *IUPHAR Reviews* 25 *Br J Pharmacol* 175: 3-17.
- Hessabi B, Ziegler P, Schmidt I et al., 1999. The nuclear localization signal (NLS) of PDX-1 is part of the homeodomain and represents a novel type of NLS. *Eur J Biochem* 263: 170-7.
- Holst JJ 2002. Glucagon and glucagon like peptides 1 and 2. *Result Probl Cell Differ* 50: 121-35.
- Holst JJ 2007. The physiology of glucagon-like peptide-1. *Physiol Rev* 87: 1409-39.
- Holst JJ, Vilsboll T, Deacon CF 2009. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus *Mol Cell Endocrinol* 297: 127- 36.

- Holst JJ 2010. Glucagon and glucagon like peptides 1 and 2. *Results Probl Cell Differ* 50: 121-35.
- Houssay B 1952. The discovery of pancreatic diabetes. *Diabetes* 1: 112-6.
- Inagaki N, Seino Y, Takeda J et al., 1989. Gastric inhibitory polypeptide structure and chromosomal localization of the human gene. *Mol Endocrinol* 3: 1014-21.
- Isaksson B, Wang F, Permert J et al., 2005. Chronically administered islet amyloid polypeptide in rats serve as an adiposity inhibitor and regulates energy homeostasis. *Pancreatology* 5: 29-36.
- Iype T, Francis J, Garmey JC et al., 2008. Mechanism of insulin gene regulation by pancreatic transcription factor PDX-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess the formation of functional transcription complexes. *J Biol Chem* 280: 16798-807.
- Jensen J, Serup P, Karlsen C, Nielsen TF, Madson OD 1996. mRNA profiling of rat islet tumors reveals Nkx 6.1 as a beta cell specific homeodomain transcription factor. *J Biol Chem* 271: 18749- 58.
- Jiang G, Zhang BB 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol* 284: E 671- 8.
- Johansson BL, Sjoberg S, Wahren J 1992. The influence of human C peptide on renal function and glucose utilization in type 1 (insulin dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 121-8.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H 1994. Insulin promoter factor-1 is required for pancreas developmet in mice. *Nature* 371: 606-9.
- Kahn CR, Sechter Y 1992. Insulin, hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pâncreas. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman-Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P (editors). McGraw-Hill, Inc New York, USA p. 1463-95.
- Kajihara M, Sone H, Amemiya M et al., 2003. Mouse MaFA homologue of zebrafish somite MaF1 contributes to the specific transcription activity through the insulin promoter. *Biochem Biophys res Commun* 312: 831-42.
- Kalousova A, Benes V, Paces J, Paces V, Kozmik Z 1999. DNA binding and transactivating properties of te paired and homeobox protein Pax-4. *Biochem Biophys Res Commu* 259: 510- 8.
- Kalra S, Baruah MP, Sahay RK et al., 2016. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes: past, present and future. *Indian J Endocrinol Metab* 20: 254- 67.
- Kaneto H, Matsuoka T, Miyatsuka T et al., 2008. PDX-1 function as a master factor in the pancreas. *Frontiers Biosci* 13: 6406-20.
- Karlsson O, Walker MD, Rutter WJ, Edlund T 1989. Individual proteins binding domains of the insulin gene enhancer positively activate beta cell specific transcription. *Mol Cell Biol* 9: 823-7.

- Kataoka K, Han SI, Shioda M et al., 2002. MaFA is a glucose regulated and pancreatic beta cell specific transcriptional activator of the insulin gene. *J Biol Chem* 277: 49903-10.
- Kieffer TJ, Habener JF 1999. The proglucagon like peptides. *Endocrinol Rev* 20: 876-913.
- Kim SH, Sussman JL, Saddath FL et al., 1974. The general structure of transfer RNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4970-4.
- Kimball C, Murlin J 1923. Aqueous extracts o pancreas.III Some precipitation reactions of insulin. *J Biol Chem* 58: 337-48.
- Kimura S, Hara Y, Pineau T et al., 1996. The T/EBP null mouse thyroid specific enhancer binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain and pituitary. *Genes Dev* 10: 60-9.
- Kiriyama Y, Nochi H 2018. Role and cytotoxicity of amylin and protection of pancreatic islet β cells from amylin cytotoxicity. *Cells* 9, 95: doi 10.3390/cells 7080095.
- Kitabci AE 1977. Proinsulin and C peptide. *Metabolism* 26: 547-87.
- Kjems I, Volund A, Madsbad S 2001. Quantification of beta cell function during IV GTT in type II and non diabetic subjects: assessment of insulin secretion by mathematical methods. *Diabetologia* 44: 1339-48.
- Knepel W, Vallejo M, Chafitz JÁ, Habener JF 1991. The pancreatic islet-specific glucagon G3 transcription factors recognize control elements in the somatostatin and insulin genes. *Mol Endocrinol* 5: 1457-66.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y et al.,1999. Ghrelin is a growth hormone releasing peptide from stomach. *Nature* 402: 656-60.
- Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR 1987. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 2: 1300-4.
- Kurashina T, Dezaki K, Yoshida M et al., 2015. The beta cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glycemic effects of ghrelin. *Sci Rep* 5: 14041.
- Kyle RA, Steensma DP, Shampo MA 2005. Oscar (Oskar) Minkowski. Discovery of the pancreatic origin of diabetes. *Mayo Clinic Proceedings* 90: e17-8.
- Lee YS, Jun HS 2014. Antidiabetic actions of glucagon like peptide -1 on pancreatic beta cells. *Metabolism Clin Exper* 63: 9-19.
- Le Lay J, Stein R 2006. Involvement of PDX-1 in activation of human insulin gene transcription. *J Endocrinol* 188: 287- 94.
- Li W, Itou J, Tanaka S, Nishimura T, sato T, Toi M 2016. A homeobox protein Nkx 6.1 up regulates interleukin-6 expression for cell growth in basal like breast cancer. *Exp Cell Res* 343: 177-89.

- Lindahl E, Nyman U, Melles E et al., 2007. Cellular internalization of proinsulin C peptide. *Cell Mol Life Sci* 64: 479-86.
- Lindahl E, Nyman U, Zaman F et al., 2010. Proinsulin C peptide regulates ribosomal RNA expression. *J Biol Chem* 285: 3462-9.
- Lints TJ, Parsons L, Hartley L, Lyons I, Harvey RP 1993. Nkx 2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendents. *Development* 119: 419- 31.
- Little RR, Rohlfing CL, Tennill A et al., 2008. Standardization of C peptide measurement. *Clin Chem* 54: 1023-6.
- Louagie E, Taylor NA, Flamez D et al., 2008. Role of furin in granular acidification in the endocrine pancreas. Identification of V-ATPase subunit Ac45 as a candidate substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12319-24.
- Lutz TA, Del Prete E, Scharrer E 1994. Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin. *Physiol Behav* 55 891-5.
- Macleod JR 1978. History of the researchs leading to the discovery of insulin. *Bull Hist Med* 52: 295-312.
- MacFarlane WM, Frayling TM, Ellard S et al., 1999. Missense mutation in insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest* 104: R33-9.
- MacFarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA et al., 1999. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX-1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274: 1011- 6.
- Mandarim-de-Lacerda CA 2019. Pancreatic islet (of Langerhans) revisited. *Histol Histopathol* DOI 10.14670/HH-18-118.
- Mandrup-Poulsen T 2001. β -cell apoptosis. Stimuli and signaling. *Diabetes* 50 (suppl 1) S 58-63.
- Mani EK, Shankar K, Zigman JM 2019. Ghrelin's relationship to blood glucose. *Endocrinol* 160: 12476-61.
- Matsuoka TA, Artner I, Henderson E et al., 2004. The MaFA transcription factor appears to be responsible for tissue specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2930- 3.
- Meier JJ, Gallwitz B, Siepmann N et al., 2003. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) dose dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia. *Diabetologia* 46: 798-80.
- Meier JJ, Nauck MA, Pott A et al., 2006. Glucagon like peptide 2 stimulates glucagon secretion enhances lipid absorption and inhibits gastric acid secretion in human. *Gastroenterology* 130: 44-54.

Melado-Gil JM, Jimenez-Moreno CM, Martin-Montalvo A et al., 2016. Pax-4 preserves endoplasmic reticulum integrity preventing beta cell degeneration in a mouse model of type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 59: 755-65

Melloul D 2008. Role of NFkB in β cell death. *Biochem Soc Trans* 36: 334-9.

Minkowski O 1989. Historical development of the theory of pancreatic diabetes (Introduction and translation by Rachmiel Levine). *Diabetes* 38: 1-6.

Mitchell RK, Nguyen-Tu MS, Chabosseau P et al., 2017. The transcription factor Pax-6 is required for pancreatic beta cell identity, glucose regulated ATP synthesis and Ca^{2+} dynamics in adult mice. *J Biol Chem* 292: 8892-906.

Mize DLE, Salehi M 2013. The place of GLP-1-based therapy in diabetes management: differences between DPP-4 inhibitors and GLP-1 receptor agonists. *Curr Diab Rep* 13: 307- 18.

Modlin IM, Pavel M, Kidd M, Gustafsson BI 2010. Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumors. *Alim Pharmacol Ther* 31: 169-88.

Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB et al., 1986. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 261: 11880-9.

Mosselman S, Hoppener JWM, Lips CJM, Jansz HS 1989. The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons. *FEBS Lett* 247: 154-8.

Muller TD, Finan B, Clemmensen C, DiMarchi RD, Tschop MH 2017. The new biology and pharmacology of glucagon. *Physiol Rev* 97: 721-66.

Mutt V, Jorpes JE, Magnusson S 1970. Structure of porcine secretin. The amino acid sequence. *Eur J Biochem* 15: 513-9.

Mutt V, Said SI 1974. Structure of the porcine vaso intestinal octapeptide. The amino acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur J Biochem* 42: 581-9.

Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y et al., 2004. Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 110: 3674-9.

Nian M, Drucker DJ, Irwin D 1999. Divergent regulation of human and rat proglucagon gene promoters in vivo. *Am J Physiol* 277: G 828-37.

Nishi M, Chan SJ, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF 1989. Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc Natl Acad Sci* 85: 5738-42.

Nishimoto S, Nishida E 2006. MAP signalling: ERK 5 versus ERK 1/2. *EMBO Rep* 7: 782-6.

Nishizawa M, Kataoka K, Goto N, Fujiwara KT, Kawai S 1989. V-maf a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7711-5.

- Nomura S, Nakamura T, Hashimoto T et al., 2006. MaFA differentiates rat intestinal cells into insulin producing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 34: 136- 43.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA et al., 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122: 983-5.
- Ohneda K Hooi E, German M 2000. Regulation of insulin gene transcription. *Cell Develop Biol* 11: 227-33.
- Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T 1993. IPF-1 a homeodomain containing transactivator of insulin gene. *Embo J* 12: 4251-9.
- Ohtomo Y, Aperia A, Johansson BL, Wahren J 1996. C peptide stimulates rat renal tubular Na K ATPase in synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia* 39: 199-205.
- Olbrod M, Rud J, Moss LG, Sharma A 2002. Identification of beta cell specific insulin gene transcription factor ripe3B1 as mammalian mafa. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6737-42.
- Osto M, Wielinga PY, Alder B, Walser N, Lutz TA 2007. Modulation of the satiating effect of amylin by central ghrelin, leptin and insulin. *Physiol Behav* 91: 566-72.
- Paulescu N 1920. Action de l'extrait pancreatique injecté dans le sang, chez um animal diabetique. *CR Seanc Soc Biol (Paris)* 85: 555-9.
- Pigueras L, Martinez V 2004. Role of somatostatin receptors on gastric acid secretion in wild type and somatostatin receptor type 2 knockout mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370: 510-20.
- Polak JM, Pearse AG, Grimelius L, Bloom SR 1975. Growth hormone release inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells. *Lancet* 1: 1220-2.
- Polonsky KS, Licinio-Paixão J, Given BD et al., 1986. Use of biosynthetic human C peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type 1 diabetic patients. *J Clin Invest* 77: 98-105.
- Potes CS, Boyle CN, Wookey PJ, Riedger T, Lutz TA 2012. Involvement of the extracellular signal regulated kinase 1/2 signaling pathway in amylin's eating inhibitory effect. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 302: R 340-51.
- Potes CS, Lutz TA 2010. Brainstem mechanism of amylin induced anorexia. *Physiol Behav* 100: 511-8.
- Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghasi L, Sosa-Pineda B, Sussel L 2004. Ghrelin cells replace insulin producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4679-84.
- Raum JC, Hunter CS, Artner I et al., Islet beta cell specific MaFA transcription requires 5'-flanking conserved region 3 control domain. *Mol Cell Biol* 30: 4234-44.

- Ravussin E, Tschop M, Morales S, Bouchard C, Helman ML 2001. Plasma ghrelin concentration and energy balance overfeeding and negative energy balance studies in twins. *J Clin Endocr Metab* 86: 4547-51.
- Ray JD, Kener KB, Bitner BF et al., 2016. Nkx 6.1 mediated insulin secretion and β cell proliferation is dependent on regulation of c-Fos. *FEBS Lett* 590: 1791- 803.
- Riedger T, Schmidt HA, Lutz T, Simon E 2001. Amylin potently activates AP neurons possibly via formation of excitatory second messenger cGMP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R 1833-43.
- Reisine T, Bell GI 1995. Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocrinol Rev* 16: 427-42.
- Rigler R, Pramanik A, Jonasson P et al., 1999. Specific binding of proinsulin C peptide to human membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13318-23.
- Ritz-Laser B, Estreicher A, Klages N, Saule S, Philippe J 1999. Pax-6 and Cdx-2/3 interact to activate glucagon gene expression on the G 1 control element. *J Biol Chem* 274: 4124- 32.
- Ritz-Laser B, Estreicher A, Gauthier BR, Mamin A, Philippe J 2002. The pancreatic beta cell specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene through Pax-6. *Diabetologia* 45: 97-107.
- Robertus JD, Ladner JE, Finch JT et al., 1974. Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* 250: 546-51.
- Roosteman D, Kempes C, Cottrell GS, et al., 2008. Endothelin-converting enzyme-1 degrades internalized somatostatin 14. *Endocrinol* 149: 2200-7.
- Roth J, Qureshi S, Whitford I et al., 2012. Insulin's discovery. New insights on the ninetieth birthday. *Diabetes Metab Res Rev* 28: 293-304.
- Rubenstein AH, Clark JL, Melani F, Steiner DF 1969. Secretion of proinsulin C peptide by pancreatic beta cells and its circulation in blood. *Nature* 224: 697-9.
- Rudnick A, Ling TY, Odagiri H et al., 1994. Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12203- 7.
- Rushing PA, Lutz TA, Sheeley RJ, Woods SC 2000. Amylin and insulin interact to reduce food intake in rats. *Horm Metab Res* 32: 62-5.
- Rutter GA 2009. Regulating glucagon secretion: somatostatin in the spotlight. *Diabetes* 58: 209-301.
- Ryle AP, Sanger F, Smith LF, Kitair R 1955. The disulphide bonds of insulin. *Biochem J* 60: 541-56.
- Sakata N, Yoshimatsu G, Kodama S 2019 Development and characteristics of pancreatic epsilon cells. *Int J Med Sci* 20, 1867 DOI 10.3390/ijms 20081867.

- Samaras SE, Zhao L, Means A et al., 2003. The islet beta cell-enriched RIPE3b1/MaF transcription factor regulates PDX-1 expression. *J Biol Chem* 278: 12263-70.
- Sander M, Griffen SC, Huang J, German MS 1998. A novel glucose responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islet. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11572- 7.
- Sander M, Sussel L, Connors J et al., 2000. Homeobox gene Nkx 6.1 lies downstream of Nkx 2.2 in the major pathway of beta cell formation in the pancreas. *Development* 127: 5533- 40.
- Sanger F 1945. The free amino groups of insulin. *Biochem J*. 39: 507-15.
- Sanger F 1947. Oxidation of insulin by performic acid. *Nature* 160: 295-6.
- Sanger F 1949a. Fractionation of oxidized insulin. *Biochem J* 44: 126-8.
- Sanger F 1949b The terminal peptides of insulin. *Biochem J* 45: 563-74.
- Sanger F, Tuppy H 1951a The amino acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J* 49: 463-81.
- Sanger F, Tuppy H 1951b The amino acid sequence phenylalanyl chain of insulin.2. The investigation of peptides from hydrolysates. *Biochem J* 49: 481-90.
- Sanger F 1953. A disulphide interchange reaction. *Nature* 171: 1025-6.
- Sanger F 1988. Sequences, sequences, sequences. *Ann Rev Biochem* 57: 1-28.
- Sanke T, Bell GI, Sampe C, Rubenstein AH, Steiner DF 1988. An islet amyloid peptide is derived from an 89 amino acid precursor by proteolytic processing. *J Biol Chem* 263: 17243-6.
- Serup P, Jensen J, Andersen FG et al., 1996. Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor -1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9015-20.
- Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PJ, Beaumont K 1994. In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience* 62: 553-67.
- Shafqat J, Juntti-Berggren L, Zhong Z et al., 2002. Proinsulinpeptide and its analogues induces intracellular Ca²⁺ increases in human renal tubular cells. *Cell Mol Life Sci* 59: 1185-9.
- Shepherd JC, McGinnis W, Carrasco AE et al., 1984. Fly and frog homeodomains show analogies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* 310: 70-1.
- Sinclair em, Drucker DJ 2005. Proglucagon derived peptides: mechanism of action and therapeutic potential. *Physiology* 20: 357- 65.
- Smith SB, Ee HC, Conner JR, German MS 1999. Paired homeodomain transcription factor Pax-4 acts as a transcriptional suppressor in early pancreatic development. *Mol Cell Biol* 19: 8272-80.

- Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Gruss P 1997. The Pax-4 gene is essential for differentiation of insulin producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386: 399-402.
- Spiess J, Rivier J, Thomer M, Vale W 1982. Sequence analysis of growth hormone releasing factor from human pancreatic islet tumor. *Biochemistry* 23: 6037- 40.
- Staub A, Sinn L, Behrens OK 1953. Purification and crystallization of the hyperglycemic glycogenolytic factor (HGF). *Science* 117: 628-9.
- Steffes MW, Sibley S, Jackson M, Thomas W 2003. Beta cell function and the development of diabetes related complications in the diabetes control and complication trial. *Diabetes Care* 26: 832-6.
- Steiner DF, Park SY, Stoy J, Philipson LH, Bell GI 2009. A brief perspective of insulin production. *Diabetes Obes Metab* 11 (suppl 4): 189-96.
- Stoffer DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF 1997. Early onset type 2 diabetes mellitus (MODY) linked to IPF-1. *Nat Genet* 17: 138-9.
- St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhuri K, Mansouri A, Gruss P 1997. Pax-6 is required for differentiation of glucagon producing alpha cells in mouse pancreas. *Nature* 387: 406-9.
- Sussel L, Kalamares J, Hartigan-Ó-Connor DJ et al., 1998. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx 2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125: 2213- 21.
- Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N et al., 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocr Metab* 25: 4908-11.
- Thim L, Moody AJ 1981. The primary structure of porcine glicentin (proglucagon). *Regulatory Pept* 2: 139- 50.
- Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S et al., 2001. determinants of the impaired secretion of glucagon like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metb* 86: 3717-23.
- Tsimaratos M, Roger F, Chabardes D et al., 2003. C peptide stimulates Na K ATPase via PKC in rat medullary thick ascending limb. *Diabetologia* 46: 124-31.
- Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S et al., 2007. In vivo suppression of MaFA mRNA with siRNA and analysis of the resulting alteration of the gene expression profile in mouse pancreas by microarray method. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 129-35.
- Vale W, Rivier J, Ling N, Brown M 1978. Biologic and immunologic activities and application of somatostatin analogs. *Metabolism* 9 (suppl 1): 1391-401.
- Vale W, Ling N, Rivier J et al., 1976. Anatomic and phylogenetic distribution of somatostatin. *Metabolism* 11(suppl 1): 1491-4.
- Vieira E, Salehi A, Gylfe E 2007. Glucose inhibits glucagon secretion by direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 50: 370- 9.

- Viltsboll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ 2002. Defective amplification of the late phase of insulin response to glucose by GIP in obese type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 45: 1111-9.
- Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C 1996. Transcriptional activation of the GLUT 2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeofactor. *Mol Endocrinol* 10: 1327-34.
- Wahren J, Ekberg K, Johansson BL 2000. Role of C peptide in human physiology. *Am J Endocrinol Metab* 278: E 759-68.
- Wallerath T, Kunt T, Forst T et al., 2003. Stimulation of endothelial nitric oxide synthase B by proinsulin C peptide. *Nitric Oxide* 9: 95-102.
- Wang H, Brun T, Kataoka K, Sharma AJ, Wollheim CB 2007. MaFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 50: 348-58.
- Wen JH, Chen YY, Song SJ et al., 2009. Paired box 6 (Pax-6) regulates glucose metabolism via insulin processing mediated by pro-hormone convertase. *Diabetologia* 52: 504-13.
- Westermarck P, Wernstedt C, O'Brien TD, Hayden DW, Johnson KH 1987. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contain a novel putative polypeptide hormone. *Am J Pathol* 127: 414-7.
- Westermarck P, Engstrom U, Johnson KH, Westermarck GT, Betsholtz C 1990. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino residues linked to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci* 87: 5036-40.
- Whiting L, Stewart KW, Hay DL et al., 2015. Glicentin-related polypeptide inhibits glucose-stimulated insulin secretion from isolated pancreas of adult male rats. *Physiol Rep* 3(12): e12638. Doi 10.14814.
- Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F 2002. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107: 63-9.
- Wilding L, Gannon M 2004. The role of PDX-1 and HNF-6 in proliferation and differentiation of endocrine precursors. *Diabetes Metab Res Rev* 20: 114-23.
- Willms B, Werner J, Holst JJ et al., 1996. Gastric emptying glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 327-32.
- Yabe D, Seino Y 2011. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and beta cell preservation. *Progr Biophys Mol Biol* 107: 248-56.
- Yada T, Damdindorj B, Rita RS et al., 2014. Ghrelin signalling in beta cells regulates insulin secretion and blood glucose. *Diabetes Obes Metab* 16 (suppl 1): 111-7.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL 2008. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin and appetite stimulating peptide hormone. *Cell* 132: 387-96.

Young A, Denaro M 1998. Roles of amylin in diabetes and regulation of nutrient load. *Nutrition* 14: 524-7.

Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M et al., 2005. MaFA is a key regulator of the glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 25: 4969-76.

Zunz E, La Barre J 1929. Contribution a l'étude des variations physiologiques de La secretion interne du pancreas: relation entre le secretion externe et interne du pancreas. *Arch Int Physiol Biochem* 31: 20-44.

CAPÍTULO 4 - INSULINA: TRANSDUÇÃO DE SINAL

INTRODUÇÃO

As células ou tecidos se comunicam, e essa comunicação, também conhecida como transdução de sinal entre células ou tecidos, ocorre em duas etapas: a transdução de sinal intercelular caracteriza a passagem de um sinal de uma célula para a célula alvo e para isso a célula alvo deve ser equipada para captar o sinal enviado, via proteínas dispostas em sua superfície; a transdução de sinal intracelular compreende a decodificação bioquímica do sinal recebido pelas células, um processo que envolve a regulação de proteínas de sinalização intracelular, resultando alterações funcionais de proteínas envolvidas no metabolismo, regulação gênica, transporte de membrana e motilidade celular. As vias de transdução de sinal seguem um curso mais ou menos semelhante a um circuito molecular, como mostra o esquema que se segue.

SINAL ----- ► RECEPTOR ----- ► TRANSDUÇÃO

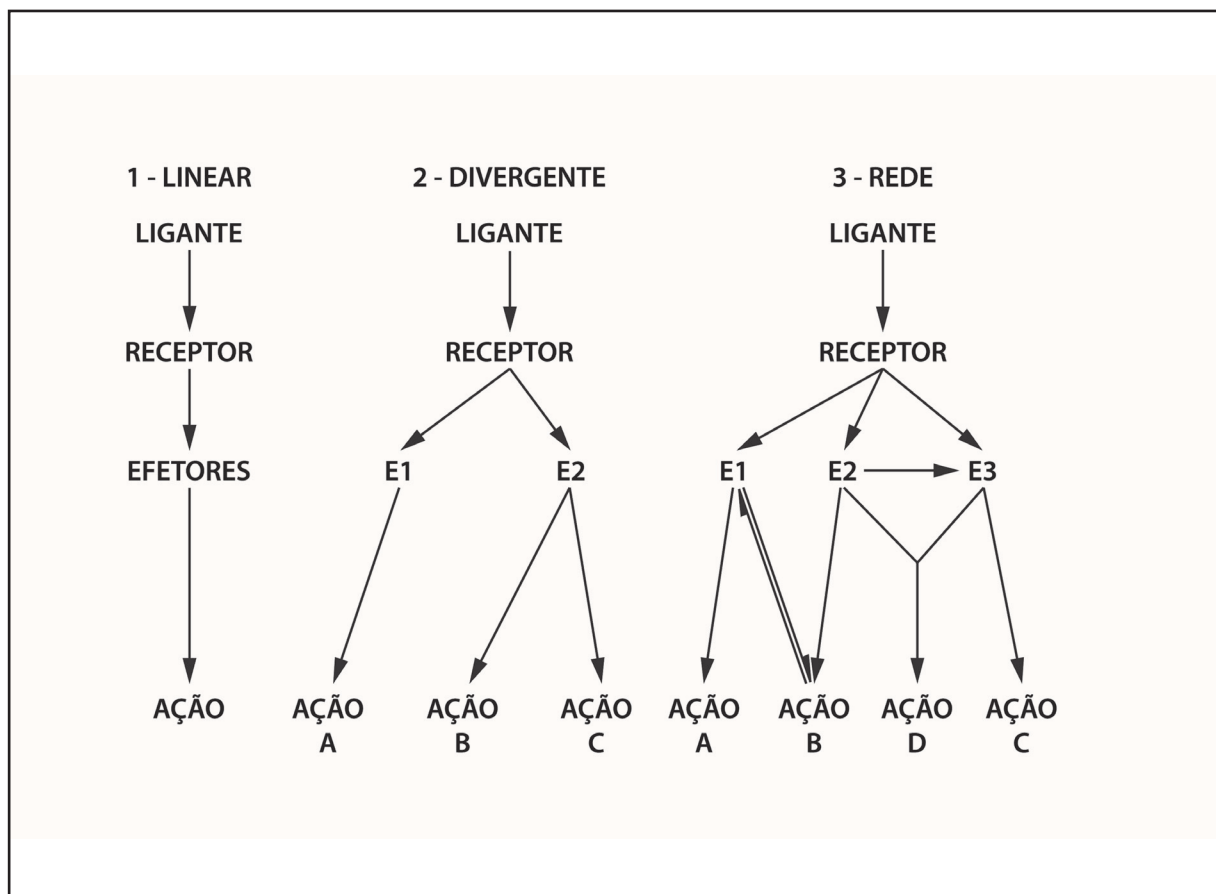
Um sinal como o qual os hormônios carregam, interage primeiramente com os componentes celulares, os chamados receptores de superfície. A informação levada pelo hormônio é convertida numa forma química ou traduzida. Em geral esse sinal é ampliado várias vezes. Essa sinalização evocada por hormônios (sinalização endócrina) pode ocorrer entre células separadas por distâncias curtas ou longas. Tecidos glandulares sintetizam e secretam moléculas ditas hormônios. O termo hormônio, refere-se a qualquer substância que sintetizada e secretada por tecidos glandulares, carrega um sinal para gerar um tipo de alteração ao nível celular. Já vimos em capítulos anteriores, que os hormônios podem ser classificados em: (a) hormônios endócrinos, aqueles que produzidos num tecido ou glândula são levados pela corrente circulatória para alcançar a célula alvo, que expressa o receptor cognato, caso por exemplo da insulina; (b) hormônios parócrinos, os que são produzidos por uma célula, viajam uma distância relativamente curta para interagir com seus receptores cognatos e (c) hormônios autócrinos, os que são produzidos pela mesma célula que funciona como célula alvo. O receptor recebe a informação através da membrana e a transfere para o interior da célula. O receptor, de natureza protéica e intrínseca a membrana, possui uma região extracelular e uma região intracelular. O sinal (ligante) é reconhecido por uma região do receptor, disposta extracelularmente, chamada sítio de ligação. A interação do ligante (sinal) com o receptor provoca neste, alteração na estrutura terciária e quaternária, da região intracelular. Já vimos em capítulo anterior que a estrutura secundária, refere-se ao dobramento localizado numa cadeia polimérica com formação de α hélice e β folha dobrada. A estrutura terciária refere-se a forma tridimensional de um polipeptídeo, que resulta de interações de partes distantes. Portanto, receptores são proteínas celulares específicas, responsáveis pela transmissão de qualquer sinal externo à célula, seja ela de natureza física, química ou biológica. Em outras palavras, receptor é uma proteína, que ao se ligar ao agonista que lhe é específico resulta uma resposta específica. Uma vez formado o complexo ligante-receptor, entra em ação o chamado segundo mensageiro, que tem a função de passar o sinal recebido para frente. Os segundos mensageiros são moléculas pequenas e são livres para se difundirem a outros compartimentos celulares. Assim, por exemplo, se se difundirem ao núcleo podem influenciar a expressão gênica. Entre os segundos mensageiros mais conhecidos destacamos a adenosina monofosfato cíclico (cAMP), a guanosina monofosfato

cíclico (cGMP), o cálcio (Ca^{2+}), o inositol trifosfato (IP3) e o diacil glicerol (DAG). O sinal pode ser amplificado, isto é, cada molécula ativada pode levar a geração de muitos segundos mensageiros dentro da célula. Dessa forma, um sinal mesmo de baixa concentração, pode fornecer resposta de grande amplitude.

A propagação do sinal recebido pelos segundos mensageiros, resulta na ativação de proteínas quinases. As quinases pertencem a um grupo de enzimas classificadas como transferases, as quais transferem um grupo químico de uma molécula à outra, de modo que possuem dois substratos produzindo dois produtos. As proteínas quinases transferem grupos fosforilas da adenosina trifosfato (ATP) para resíduos de amino ácidos como serina, treonina e tirosina, de proteínas. Após o processo de sinalização ter se iniciado e a informação ter sido transduzida para regular outros processos, ele deve ser terminado. O mecanismo para interromper o processo de sinalização é a desfosforilação, uma reação catalisada por fosfatases. As fosfatases são membros de enzimas classificadas como hidrolases. As hidrolases catalisam reações de hidrólise, isto é, usam a água para esse fim. A identificação de receptores específicos, bem como o sistema de segundos mensageiros, como por exemplo o cAMP, levou a visão de um sistema de sinalização em cascata linear. Porém, com o passar dos tempos e novos estudos sendo publicados, ficou claro, que além da cascata linear temos entre as vias de sinalização, outros sistemas, como o divergente e o de rede.

Devido ao envolvimento de várias moléculas neste processo, nosso conceito de sinalização se desenvolveu de uma simples cascata linear para uma rede complexa [Taniguchi, Emanuelli, Kahn 2006] (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Representação esquemática de sistemas de sinalização



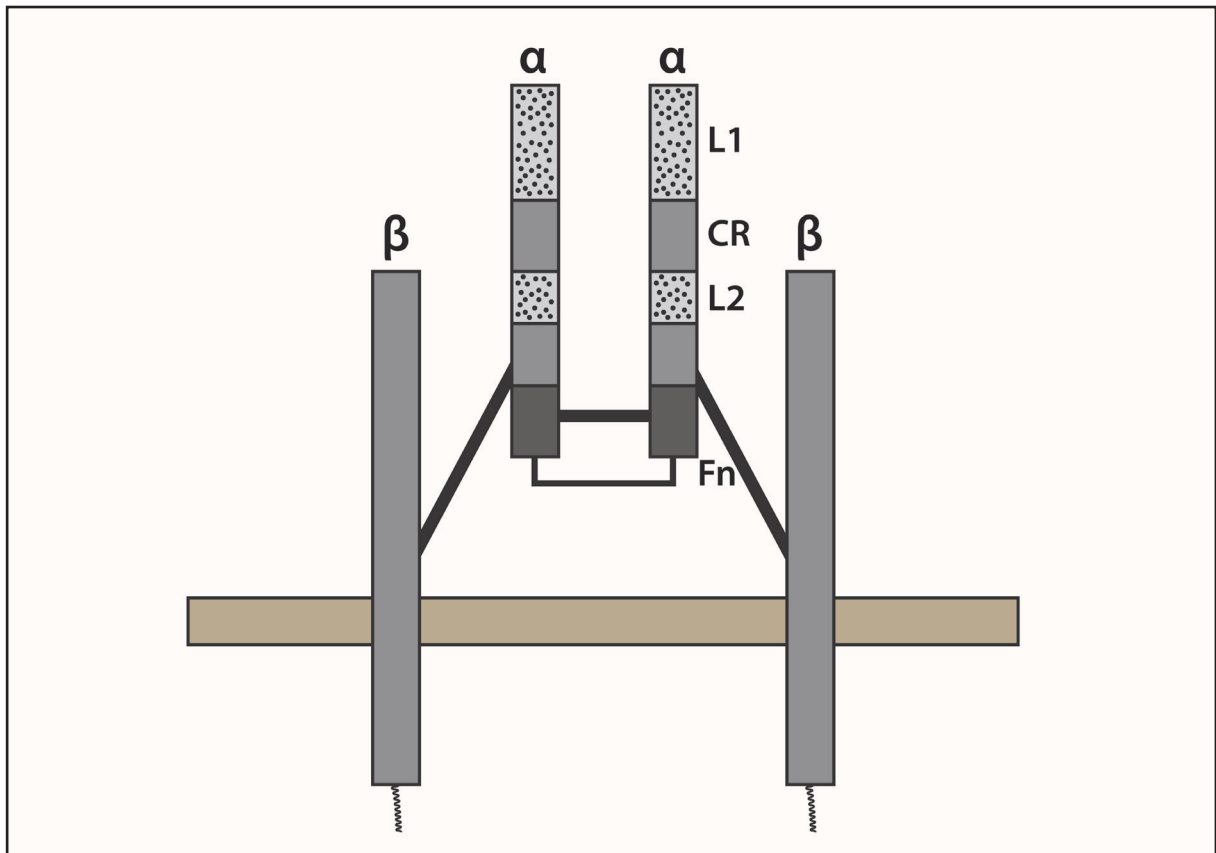
ESTRUTURA E FUNÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA

O receptor de insulina é um membro da família de receptores, que contém em sua estrutura a tirosina quinase e também, inclui o receptor do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1R). O receptor de insulina está presente virtualmente em todos os tecidos de vertebrados, embora a concentração pode variar de poucos, como 40 receptores nos eritrócitos circulantes a mais de 200 mil receptores nos adipócitos e hepatócitos [White, Kahn 1994]. Descrito pela primeira vez em 1971 em tecido adiposo [Cuatrecasas 1971], o receptor de insulina, quando solubilizado em detergente não iônico e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mostrou ser um homodímero, constituído por duas cadeias α e duas cadeias β , ligadas entre si por pontes dissulfeto (-S-S-) [Hedo, Kasuga et al., 1981; Massague, Pilch, Czech 1981; Siegel, Ganguly et al., 1981].

Toda a cadeia α e mais 194 resíduos de aminoácidos da cadeia β , são extracelulares, há uma sequência simples transmembrana e 403 resíduos de aminoácidos na região citoplasmática, contendo a tirosina quinase. O receptor é fortemente glicosilado apresentando ligações O- e N-glicanos. Os glicanos ligados na posição O- são do tipo mucina, contendo em sua extremidade ou o ácido siálico ou a galactose. [Sparrow, Gorman et al., 2007]. Nas glicoproteínas as ligações entre os carboidratos e as proteínas ocorrem ou com o átomo de nitrogênio, denominado ligação N- ou com o átomo de oxigênio da cadeia lateral de serina ou treonina, dita ligação O-. Dessa forma o sítio de glicosilação potencial pode ser detectado dentro da sequência de amino ácidos da cadeia polipeptídica. Os glicanos, também conhecidos como polissacarídeos, consistem em monossacarídeos, ligados entre si por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos podem ser homopolissacarídeos quando formados por um único tipo de unidade monomérica ou heteropolissacarídeo quando formados por dois ou mais unidades monoméricas diferentes. Em cada monômero do dímero do receptor de insulina foram descritos dois sítios de ligação diferentes, localizados em duas regiões diferentes do monômero [De Meyts, Whittaker 2002; De Meyts 2004; Mckern, Lawrence et al., 2006; Ward, Lawrence et al., 2007].

A organização estrutural do receptor de insulina revela, que cada região extracelular inclui, as duas cadeias α , bem como 194 resíduos de aminoácidos cada cadeia β . Cada monômero, consiste em vários domínios estruturais, incluindo um domínio rico em leucina L-1 (resíduos 1-157), uma região rica em cisteína (CR resíduos 158-310), um segundo domínio rico em leucina (L-2 resíduos 311- 470) e três regiões do tipo fibronectina: FnIII-1 (resíduos 471-595), FnIII-2 (resíduos 596-808) e FnIII-3 (resíduos 809-906). O domínio FnIII-2 contém 120 resíduos, o domínio de inserção ID (*insert domain*) (resíduos 638-756). Através da análise da estrutura cristalina foi detectado uma parte chamada α CT (C-Terminal) [Smith, Huang et al., 2010; Croll, Smith et al., 2016; Adams, Epa et al., 2000; Ward, Garrett 2004; Mc Kern, Lawrence, Streltsov 2006] (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Esquemática da estrutura do receptor de insulina mostrando as subunidades α e β e o sítio de ligação a insulina

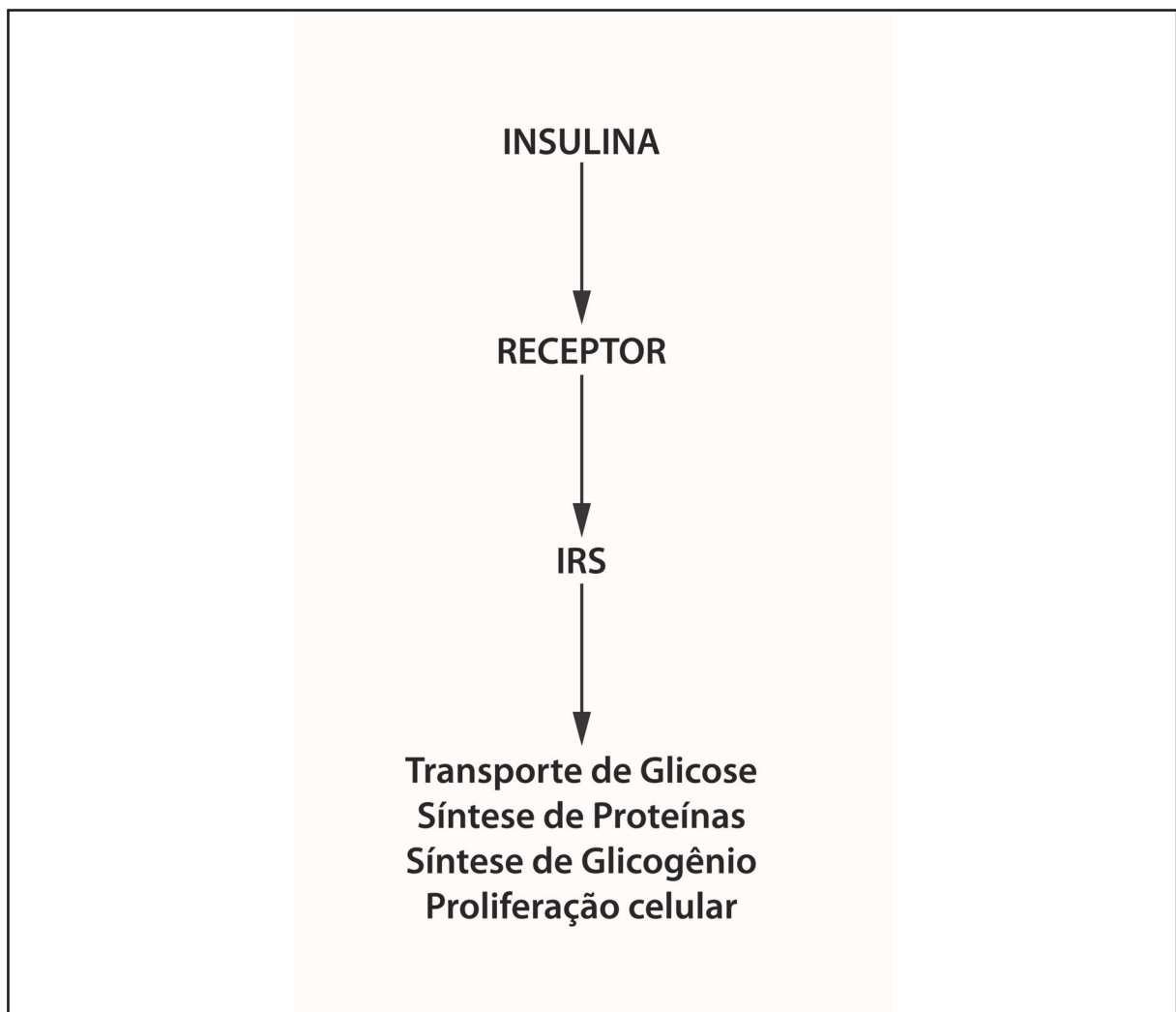


A fibronectina é uma glicoproteína periférica que interage com a matriz extracelular. Cada monômero $\alpha - \beta$ tem uma organização de V invertido relativa a membrana celular. Uma perna do V invertido é formada pelos domínios L-1, CR e L-2 enquanto a outra perna é formada por um arranjo linear dos três domínios Fn III. O domínio de inserção é bem desordenado. No ápice do V invertido repousa a conexão entre L-2 e Fn III-1 [Mc Kern, Lawrence, Streltsov 2006].

Duas isoformas de receptor de insulina foram descritos, a isoforma IR-A, um receptor de alta afinidade para o fator de crescimento semelhante a insulina, GF-II (*insulin growth factor*) e que juntamente com o receptor IGF-1, tem sido implicado na transformação maligna [Denley, Wallace et al., 2003]. A variante IR-B difere do IR-A pela presença de um segmento de 12 resíduos de aminoácidos. A ligação do ligante ao receptor induz autofosforilação dos resíduos de tirosina localizados nas subunidades β da porção citoplasmática facilitando, por conseguinte, a ligação de substratos protéicos citoplasmáticos. A propagação do sinal se dá pela ligação de muitos receptores autofosforilados a proteínas contendo dois domínios de homologia Src (proteínas SH2 e SH3). O Src constitui uma família de proteínas tirosina quinases ancoradas à superfície da membrana plasmática e associada com domínio intracelular de certos receptores desprovidos de atividade catalítica intrínseca. Contém domínios de homologia SH2 e SH3. O domínio SH2 é constituído por aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, que ligam peptídeos contendo fosfotirosina. Essa ligação se dá mediante interação com resíduos de arginina da região conservada. A ligação de proteínas SH2 depende da sequência de aminoácidos ao redor do sítio de autofosforilação da tirosina em cada receptor [Cantley, Auger et al., 1991]. Algumas proteínas de sinalização, como a Src localizam-se na face citoplasmática da membrana, onde podem receber e transmitir a informação. A proteína Src é codificada pelo gene Src e tem uma sequência de amino-ácidos

similares a uma proteína presente nas células musculares da galinha, que são referidas c-src (c de células). A estrutura conformacional inativa da c-src apresenta uma relação complexa entre os três domínios (SH2, SH3 e atividade tirosina quinase). Por exemplo, as proteínas de sinalização do fator de crescimento, GH (*growth factor*) são dotadas de regiões SH2 e SH3, com sítios de ligação que promovem a interação proteína-proteína, que transmite o sinal. O modelo atual para a ligação da insulina propõe que cada monômero no dímero do IR contém dois sítios diferentes de ligação (sítio 1 e sítio 2) localizados em duas regiões diferentes de cada monômero. A ligação da insulina ao sítio de baixa afinidade (sítio 1) em qualquer uma das subunidades é seguido por um segundo evento de ligação entre a insulina ligada e o segundo sítio [De Meyts, Whittaker 2002; De Meyts 2004; Mc Kern, Lawrence et al., 2006]. Experimentos computacionais e de atracação indicam que uma leve abertura dos segmentos Fn III-1 e Fn III-2 é necessário para facilitar a entrada da insulina no sítio de ligação 2 após o encaixe com o sítio 1, sugerindo que tal abertura, também faz parte do mecanismo de ligação [Ye, Maji et al., 2017]. Após a fosforilação da tirosina na tirosina quinase há uma alteração conformacional com reorientação das extremidades N e C- terminal da região da tirosina quinase que facilita a ligação de ATP (Figura 4.3). As extremidades N e C terminais, movem em direção a cavidade catalítica formando uma conformação mais compacta e estável [Ye, Maji et al. 2017] O receptor IRS (insulin receptor substrate) acopla com o receptor de insulina ao fosfoinosítídeo 3 quinase (PI-3K).

Figura 4.3 - Esquema da formação do complexo ligante (insulina)-receptor e ativação da enzima tirosina quinase da cadeia beta da região citoplasmático



O PI-3K é ativado e a ação dessa enzima produz o fosfatidil inositol-3,4-bisfosfato (PI-3,4-P₂) e o fosfatidil inositol-3,4,5 trifosfato, (PI-3,4,5-P₃), os quais atraem as serino quinases (quinases que fosforilam o resíduo de serina), para a membrana plasmática, incluindo o fosfoinositídeo-1 (PDK-1) e o fosfoinositídeo-2 (PDK-2) bem como a proteína quinase B (PKB). A PKB (ou Akt) ativada fosforila muitos substratos para controlar várias cascatas de sinalização, incluindo transporte de glicose, síntese de proteínas, síntese de glicogênio, proliferação celular e sobrevivência celular [White 2002; Alessi, Cohen 1998; Brunet, Bonni et al. 1999; Yenush, White 1997]. O PKB fosforila predominantemente o PI-4,5-P₂ na posição 3 produzindo o PI-3,4,5, P₃, importante no tráfico de membrana.

O SISTEMA IRS DE SINALIZAÇÃO

Já vimos anteriormente, que durante a estimulação exercida por fatores de crescimento e citocinas nas células, receptores específicos de superfície são ativados, resultando a fosforilação de resíduos de tirosina na região intracelular do próprio receptor. A sinalização da insulina, bem como do IGF, requer uma família de proteínas, que atua como andaimes (proteínas IRS) para que sinais extracelulares sejam integradas com respostas intracelulares. Em muitos casos, proteínas de sinalização como homologia 2 src (proteínas SH2) ligam diretamente a esses segmentos contendo fosfotirosina [Pawson 1995]. Contudo, nem todos os receptores se associam diretamente com proteínas SH2. Um grande número desses receptores, utilizam proteínas citoplasmáticas de atracção, fornecendo uma interface entre o receptor ativado e várias proteínas SH2 [Platanias, Colamonici 1992; Argetsinger, Hsu al., 1995; Sun, Wang et al., 1995; Holgado-Madruga, Emlet et al., 1996].

A utilização de anticorpos antifosfotirosina forneceu as primeiras evidências da existência de um substrato direto para o receptor de insulina. Isolado de hepatomas por eletroforese em gel de poliacrilamida, com uma migração no intervalo entre 165 e 190 KDa a proteína foi designada PP 185 [White, Maron, Kahn 1985], localizada no citoplasma e contendo fosfotirosina, fosfoserina e fosfo treonina, após estímulo pela insulina [White, Stegmann et al., 1987], posteriormente “insulin receptor substrate 1” (IRS-1) [Sun, Rothenberg et al., 1991]. Em humanos foram inicialmente, descritas duas proteínas IRS principais IRS-1 e IRS-2, que são amplamente expressas nos tecidos de mamíferos, enquanto uma terceira proteína IRS-4 é expressa no hipotálamo [Sadagurski, Dong et al., 2014; Lavin, White, Brazil 2016].

Muito embora o IRS-1 tenha sido descrito como substrato do receptor de insulina, foi demonstrado que ele pode ser fosforilado por múltiplos sistemas, dos quais podemos citar além do receptor de insulina e do receptor do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), outros como interleucinas, hormônio do crescimento (GH) e interferons [Uddin, Yenush et al., 1995; Platanias, Uddin et al., 1996]. As proteínas IRSs não contém atividade catalítica intrínseca, contudo contém domínios que intervêm na interação com o receptor e com efetores de IRS. Na região N- terminal (grupo aminico livre) há um domínio de homologia “pleckstrin” (PH) adjacente ao domínio de ligação fosfotirosina (PTB), e a região C-terminal (grupo carboxílico livre) codifica numerosos resíduos de tirosina e serina susceptíveis de fosforilação [Sun, Rothenberg et al., 1991; Sun, Wang et al., 1995; White 2002].

O domínio de homologia pleckstrin (PH) é uma região contendo cerca de 120 resíduos de amino ácidos, que liga lipídeos, como o fosfoinositídeo difosfato (PIP₂), via cabeça do lipídeo, associado ao domínio catalítico por um conjunto de 4 regiões de mão E-F (a mão E-F representa um laço da região hélice-alça-hélice da proteína). Embora a sequência de amino ácidos do domínio PH seja diferente, sua estrutura secundária compreende 7 cordas de conformação beta em folha

dobrada e uma alfa hélice [Lemmon, Ferguson 1996; Ferguson, Lemmon et al., 1994]. Podemos concluir que o domínio PH se constitui num requisito para a fosforilação da tirosina do IRS pelo receptor de insulina [Burks, Pons et al., 1997]. O domínio PTB interage com a sequência de tirosinas fosforiladas nos receptores de insulina e fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1). Cerca de 20 resíduos de tirosina fosforilados, contribuem ao sítio de atracção para o curso das proteínas de sinalização incluindo fosfatidilinositol-3-quinase, fosfotirosina fosfatase e outras [Thirone, Huang, Klip 2006]. Dessa forma, podemos concluir que as proteínas IRS desempenham um papel central na sinalização de insulina. Seis membros da família IRS foram identificados em células de mamíferos (IRS-1 a IRS-6), compartilhando estruturas similares. A isoforma IRS-1 foi inicialmente identificada em células hepatoma e subsequentemente em vários tecidos, incluindo músculo, coração, fígado, adipose e rins [White, Maron, Kahn 1985; Schmitz-Peiffer, Whitehead 2003]. O IRS-1 apresenta um peso molecular de 131.000 Da e através de eletroforese em gel de poliacrilamida essa proteína migra com um peso molecular aparente de 185.000 Da. Enquanto o IRS-1 e o IRS-2 são largamente distribuídos, o IRS-3 é limitado aos adipócitos e cérebro e o IRS-4 é expresso primariamente em tecidos embrionários. Tanto o IRS-5 quanto o IRS-6 parece terem expressão e função limitados na sinalização [Sun, Rothenberg et al., 1991; Sun, Wang et al., 1995; Lavan, Lane, Lienhard 1997; Fantin, Sparling et al., 1998; Cai, Dhe-Paganon et al., 2003].

O IRS-1 contém discretos domínios modulares. Duas regiões de sequências similares, foram descritos, uma região de sequência de amino-ácidos semelhantes a homologia “pleckstrin” (PH), denominada IH1PH, a segunda região foi designada IH2PTB porque contém o domínio de ligação fosfotirosina funcional [Wolf, Trub et al., 1995]. O domínio PH do IRS-1 é um requisito para evocar uma ótima resposta. Quando esse domínio é deletado, há uma significativa redução do processo de fosforilação da tirosina, estimulado pela insulina, enquanto a fosforilação tanto da serina quanto da treonina não sofrem interferência, isto é, são mantidas [Myers, Grammer et al., 1995]. Aparentemente a presença dos domínios PH (IH1PH) e PTB (IH2PTB) juntos, aumenta a sensibilidade de acoplamento entre IRS-1 e níveis endógenos do receptor de insulina na maior parte de células e tecidos [Yenush, White 1997; Yenush, Makati et al., 1996]. No centro e no C-terminal da proteína IRS há cerca de 20 sítios potenciais de fosforilação de tirosina pelo receptor de insulina (IR), que liga moléculas intracelulares contendo domínio de homologia src (domínio SH2) [Taniguchi, Emanuelli, Kahn 2006].

Entre as proteínas que ligam proteínas IRS fosforiladas, que contém o domínio SH2, destacamos as subunidades do fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e a proteína fosfatase 2 (SHP-2) [Myers, Mendez et al., 1998]. Há ainda proteínas, que não contém o domínio SH2, que também ligam IRS-1 como ATPases cerca 1 e 2 [Algenstaed, Antonetti et al., 1997]. Nas células musculares o IRS-1, mas não o IRS-2, constitui-se num requisito para a diferenciação de mioblastos e do metabolismo da glicose, enquanto, o IRS-2 é importante para o metabolismo lipídico e ativação do ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) [Huang, Thirone et al., 2005; Bouzakri, Zachrisson et al., 2006]. Além de fosforilar a proteína IRS, o receptor de insulina pode fosforilar vários outros substratos [Siddle 2012].

Experimentos usando animais mostraram, que camundongos sem o IRS-1 e IRS-2 são marcadamente resistentes à insulina. Como ocorre nesses animais, podemos também concluir sua ocorrência em humanos [Araki, Lipes et al., 1994; Kadowaki, Tamemoto et al., 1996; Withers, Gutierrez et al., 1998]. Como já vimos, o acoplamento dos receptores de insulina/IGF a PI-3K e a cascata do ERK (*extracellular signal regulated kinase*) é realizada pela proteína IRS. A enzima PI-3K é um dímero composto de subunidade catalítica (110 KDa), que está associado não covalentemente a uma subunidade reguladora. A enzima PI-3K é ativada quando o motivo (*motifs*) “YMXM” fosforilado na proteína IRS ocupa ambos os domínios src homologia-2 (SH2)

na subunidade reguladora [Backer, Myers et al., 1992]. “Motivos (*motifs*)” é um conjunto de resíduos de aminoácidos, presentes em diferentes polipeptídeos ou de nucleotídeos em ácidos nucléicos, que apresentam uma determinada função. A PI-3K é uma enzima presente no organismo, que atua nos inositoisfosfolipídeos e é componente da família de sinalização. Essa enzima fosforila predominantemente o fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PI-4,5-P₂)) produzindo o fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PI-3,4,5-P₃), o qual exerce um papel crítico como segundo mensageiro na regulação de trânsito na membrana plasmática e motilidade celular. Os domínios SH2 são domínios não catalíticos que intermediam interações proteína-proteína, ligando ao resíduo fosfotirosina em várias proteínas. [Backer, Myers et al., 1992; Sun, Rothenberg et al. 1991]. Uma vez ativada pelo receptor tirosina quinase ou pela proteína G acoplada ao receptor, a PI3K produz o, PI-3,4,5-P₃, o qual ativa a proteína quinase B (também chamada AKT). A ativação da AKT, ativa vários efetores, entre os quais a GSK-3 β (glicogênio sintase 3-quinase). Essa enzima é um dos efetores que regulam o metabolismo do glicogênio. A alta expressão de GSK-3 β foi correlacionada com a redução da sensibilidade a insulina, com implicação na regulação da glicose sanguínea, deficiência e resistência à insulina. Se glicogênio sintase, que promove a síntese de glicogênio e reduz o nível de glicose do sangue, não for inibida, resulta em hiperglicemia. Havendo disfunção da sinalização da insulina, aumenta a atividade de GSK-3 β para eventualmente aumentar a glicose sanguínea [Arneth, Arneth, Sham 2019]

PROTEÍNAS Shc

As proteínas Shc constituem uma família de moléculas adaptadoras, que atuam como um andaime molecular, em várias vias de sinalização, incluindo as que são mediadas por sinais extracelulares diferentes, como fatores de crescimento, citocinas e integrinas. A estrutura das proteínas Shc apresenta um domínio de ligação fosfotirosina (*PTB de PhosphoTyrosine Binding*), na extremidade N-terminal (grupo amina livre), um domínio de homologia 2 Src na extremidade C-terminal (grupo carboxílico livre), além de um domínio CH1 e outro CH2, domínios assim denominados, porque compartilham 50% de homologia com o colágeno 1 humano. O domínio CH1 liga as regiões PTB e SH2, enquanto o CH2 está localizado na extremidade N-terminal do Shc [Ravichandran 2001; Ahmed, Prigent 2017].

Poderíamos neste ponto perguntar qual seria o papel de proteínas de adaptação? As proteínas de adaptação, que atuam como andaimes moleculares, facilitam interações proteína-proteína, responsáveis pela propagação e organização intracelular do sinal [Ahmed, Prigent 2017].

A família Shc apresenta diversidade funcional e muitos fatores contribuem para essa diversidade: o gene pode produzir mais de um transcrito, com papéis particulares; múltiplos domínios que dão às proteínas Shc a capacidade de ligar diferentes proteínas de sinalização; proteínas Shc possuem vários resíduos de serina, treonina e tirosina, grupos potencialmente fosforiláveis, e sua estrutura facilita sua recolocação em diferentes organelas intracelulares [Ahmed, Prigent 2017].

A família Shc, consiste em pelo menos sete proteínas identificadas, produtos de 4 genes diferentes. A proteína ShcA apresenta 3 isoformas, p46, p52 e p66 ShcA, cada uma implicada em certas vias intracelulares. Enquanto, as isoformas p46 e p52 ShcA estão envolvidas na progressão do ciclo e diferenciação celular, a isoforma p66 ShcA, desempenha papel na apoptose [Wary, Mainiero et al., 1996; Stevenson, Ravichandran, Frackelton 1999]; Migliaccio, Giorgio et al., 1999]. As proteínas ShcA são expressas em todos os tecidos com exceção do cérebro, enquanto, as outras isoformas, ShcB, ShcC e ShcD são expressos no cérebro [Jones, Hardy et al., 2007]. A proteína ShcC apresenta duas isoformas, a p67 e a p53 ShcC. O que diferencia as isoformas é o

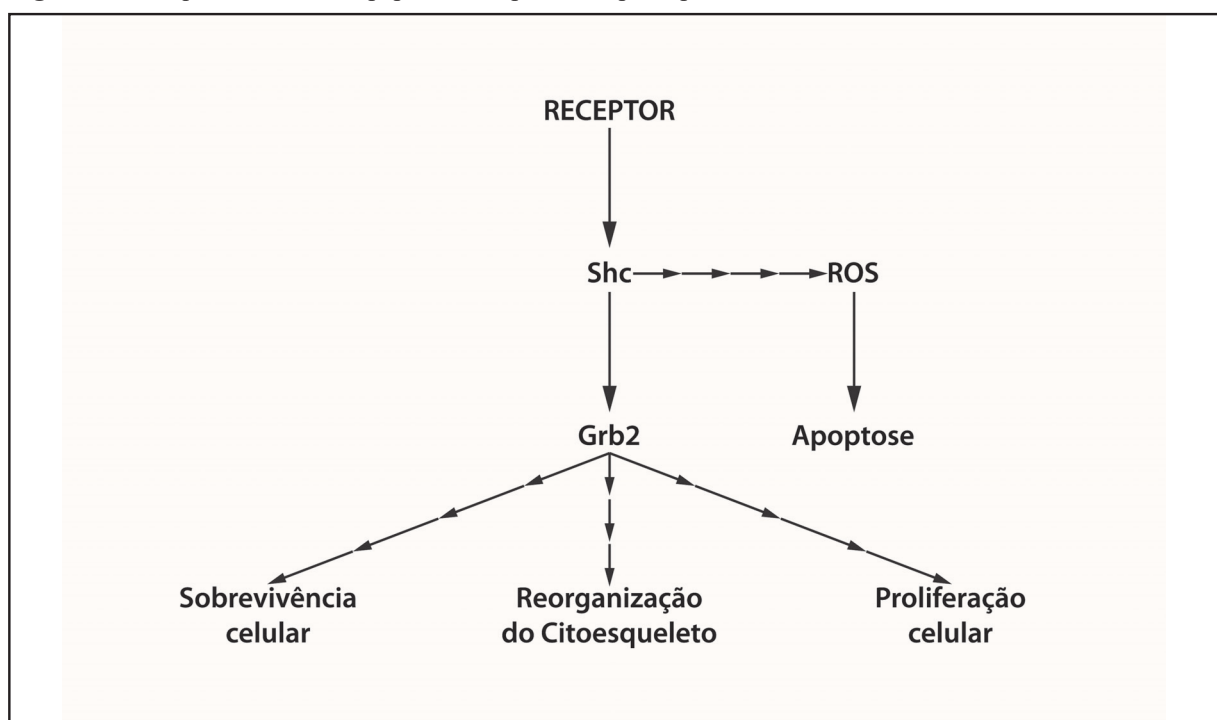
tamanho da molécula. Os domínios CH1 e CH2 são assim designados pelo fato de compartilharem 50% de homologia com o colágeno 1 humano, o qual é rico nos aminoácidos glicina e prolina.

O domínio CH2 não existe nas isoformas da família Shc menores e somente estão presentes nas isoformas p66 ShcA, p68 ShcB, p67 ShcC e p69 ShcD. A região contendo glicina e prolina permite que o domínio de homologia do colágeno atue como um sítio de atracção para proteínas contendo domínio SH3 [Ravichandran 2001].

Sobre a localização celular das proteínas Shc, pelo fato do acoplamento do receptor tirosina quinase com vias de sinalização subseqüentes, pensou-se serem citoplasmáticas, contudo, estudos mostraram a presença dessa proteína (Shc), em vários compartimentos da célula. Assim, as isoformas p52 ShcA e p46 ShcA, encontradas no citoplasma, após serem fosforilados no resíduo tirosina, deslocam para a membrana, transportando o sinal extracelular para o ambiente intracelular [Sato, Kimoto et al., 2000]. Por outro lado, a isoforma p46 ShcA, foi mostrada translocar para mitocôndria [Ventura, Maccarana et al., 2004]. Em células não estimuladas, a proteína Shc está presente no retículo endoplasmático rugoso, enquanto o tratamento com EGF (*epidermal growth factor*) estimula a redistribuição para a região da membrana e endossomo [Lotti, Lanfranccone et al., 1996]. Por outro lado, se a estimulação for via NGF (*nerve growth factor*), a proteína Shc desloca para o citoesqueleto e regiões membranosas [Thomas, Patterson, Bradshaw 1995]. Portanto, as proteínas Shc adaptadoras respondem a vários estímulos alterando sua distribuição intracelular.

As proteínas da família Shc exercem várias funções como na proliferação e diferenciação das células, na resposta ao estresse oxidativo e sobrevivência celular [Ahmed, Prigent 2017]. O receptor de membrana ativado, isto é, após a formação do complexo ligante-receptor e autofosforilação da tirosina quinase, interage com a proteína Shc, fosforilando essa proteína, que por sua vez interage com a proteína Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) levando a ativação de diferentes vias de sinalização, como o MAPK, PI3K/Akt [McGlade, Cheng et al., 1992; Collins, Ricketts et al., 1999].

Figura 4.4 - Esquema dos vários papéis desempenhados pelas proteínas da família Shc



O papel da proteína p66 ShcA na resposta ao estresse oxidativo ficou evidente em experimentos com camundongos sem essa proteína (*Knockout mice*). Sem essa proteína, o animal mostrou menor susceptibilidade ao estresse oxidativo, quando comparado ao grupo controle [Migliaccio, Giorgio et al., 1999], indicando, que essa proteína influencia a produção de espécies reativas de oxigênio. O mecanismo, pelo qual a proteína p66 ShcA atua na apoptose, induzida pelo estresse oxidativo, ficou claro em experimentos com células embrionárias de fibroblastos, tratados com estaurosporina, uma substância proapoptótica, que induz a liberação de citocromo C e ativação da caspase, uma enzima apoptótica. A proteína p66 ShcA também tem um papel proapoptótico, resultando em alterações no citocromo [Orsini, Migliaccio et al., 2004]. A figura 4.4 mostra os vários papéis da proteína Shc.

INTERNALIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA. ENDOSSOMOS

A formação do complexo insulina receptor desencadeia uma série de reações implicadas na proliferação, motilidade e metabolismo celular. Esse complexo (ativado) não deve atuar indefinidamente, isto é, deve ser interrompido. A dúvida dos pesquisadores girava em torno do local de inativação, se era na membrana plasmática ou se o complexo insulina/receptor era internalizado para ser degradado. Uma das técnicas usadas para esclarecer esse ponto foi a técnica do congelamento/descongelamento, que atua nas estruturas vesiculares, mas não na membrana plasmática. Essa técnica mostrou, que havia um aumento na concentração de sítios de ligação de insulina nas vesículas e ao mesmo tempo diminuição na membrana plasmática. Posteriormente, com insulina marcada ficou claro que o complexo era internalizado [Bergeron, Posner et al., 1978]. Em células intatas, após a ligação da insulina ao seu receptor, dentro de segundos, aumenta a fosforilação dos resíduos de tirosina das subunidades beta (tirosina quinase) [Pang, Sharma et al., 1985; Ballotti, Kowalski et al., 1987], bem como, aumenta a internalização do complexo insulina-receptor [Posner, Patel et al., 1980; Green, Olefsky 1982; Fehlmann, Carpentier et al., 1982; Bergeron, Cruz et al., 1985]. Parece existir uma relação entre a ativação de receptores e sua internalização para os endossomos. Foi demonstrado para ratos *in vivo*, que a administração de insulina aumentou a presença de receptores de insulina em endossomos [Kahn, Savoie et al., 1986]. Evidências indicam que a internalização dos receptores RTKs, incluindo o receptor de insulina, se faz por endocitose em vesículas envoltas com clatrina [Gorden, Carpentier et al., 1978; Carpentier, Gorden et al., 1982; Beattie, Howe et al., 2000], mostrando que a endocitose mediada por clatrina é a principal via de internalização do complexo ligante-receptor [Huang, Khovorova et al., 2004; Lampugnani, Orsenigo et al., 2006; von Kleist, Stahlsmidt et al., 2011]. A atividade funcional de proteínas transmembrana, incluindo os receptores tirosina quinase (RTKs) são controlados pelo tráfico intracelular. Os RTKs são sintetizados no retículo endoplasmático, transportados ao aparelho de Golgi e daí entregues à membrana plasmática. Na superfície celular o RTK sofre uma endocitose constitutiva (internalização) numa taxa similar aqueles de outras proteínas de membrana [Goh, Sorkin 2013]. Endocitose é um processo através do qual a célula capta proteínas e lipídeos da membrana plasmática, ligantes extracelulares e moléculas solúveis da superfície celular. Nesse processo, a membrana plasmática vizinha ao material a ser captado sofre uma invaginação, formando um broto intracelular seguido de sua fusão, formando uma vesícula endocítica. A função mais clara da endocitose é a de ser um processo, que serve para remover o complexo ativado ligante-receptor da superfície celular, permitindo dessa forma, que a célula receba sinais adicionais e assim possa discriminar os novos sinais dos velhos. O trânsito do receptor tirosina quinase ativado consiste num processo altamente regulado. Dois tipos de funções o trânsito de receptor poderia ter na regulação da sinalização poderia controlar

a magnitude da resposta ou poderia controlar a especificidade da resposta. Dois mecanismos são descritos para a endocitose de receptores tirosina quinase: a endocitose mediada por clatrina e a endocitose independente de clatrina.

ENDOCITOSE MEDIADA POR CLATRINA

A clatrina, como já vimos anteriormente é uma proteína não glicosilada (180 KDa), cuja sequência de amino ácidos é altamente conservada. Cerca de 95% de todas as moléculas que entram nas células por endocitose são captadas, via vesículas com revestimento de clatrina [Bitsikas, Correa, Nichols 2014]. Conceitualmente, a endocitose é um processo simples, consistindo de poucas sequências e sobreposição parcial de etapas. O processo inicia-se quando proteínas de revestimento começam a se agrupar num segmento da membrana plasmática, onde o material deve ser internalizado. A proteína de revestimento agrupada, recruta posteriormente, outras proteínas de revestimento do “pool” citossólico [Kaksonen, Roux 2018]. Uma vez formado, o revestimento promove a curvatura (invaginação) da membrana plasmática transformando-a de uma membrana plana a um “buraco” revestido de clatrina (*Clathrin-coated pit*) [Traub 2011; Weinberg, Drubin 2012].

Membranas biológicas estão em constante remodelação, pela fissão e fusão, para alterar a forma e trocar materiais entre os compartimentos subcelulares. Durante a endocitose mediada por clatrina, a dinâmica de montagem e desmontagem de proteínas auxiliares, compreendendo a superfamília de proteínas com domínio BAR (*Bin-amphiphysin-Rvs*) constringe a membrana em distintas formas a medida, que a via progride em direção a fissão por dinamina GTPase [Daumke, Roux, Haucke 2014]. Em 1989, foi descrita uma GTPase chamada dinamina que apresentava uma propriedade marcante, a de se agrupar em polímeros helicoidais contráteis, que se enrola ao redor do pescoço de vesículas que estão brotando [Shptner, Vallee 1989]. O domínio BAR é uma região, de proteínas diméricas, que liga fosfolipídeos ácidos da membrana com baixa afinidade e estabiliza ou induz a curvatura da membrana para alcançar a geometria que corresponde a forma global de sua superfície que liga a membrana [Kaksonen, Roux 2018; Daumke, Roux, Haucke 2014]. A cisão é uma etapa em que a vesícula em formação é separada da membrana doadora. O domínio BAR de proteínas coopera com a dinamina para mediar a cisão, porém tem uma dinâmica de formação distinta e define a cisão do módulo [Kaksonen, Roux 2018]. A dinamina é uma proteína (100 KDa) composta de domínio GTPase (guanosina trifosfato fosfatase) que forma um colar helicoidal no pescoço da vesícula em formação, revestida por clatrina, quebrando-a [Antony, Burd et al., 2016]. A GTPase é uma enzima que atua hidrolisando o GTP, formando GDP + P. Três propriedades da dinamina são fortemente apoiados por dados experimentais: (1) a dinamina se auto oligomeriza em hélices, circundando o pescoço de vesícula em formação; (2) Alterações conformacionais guiadas pelo nucleotídeo, promove a constrição do polímero e da membrana na presença de GTP e (3) a dinamina induz a cisão do pescoço da membrana numa forma dependente da hidrólise de GTP [Antony, Burd et al., 2016]. Oligômero é um polímero consistindo em 2, 3 ou 4 monômeros. A principal função da dinamina é a de usar a energia da hidrólise do GTP para cindir o túbulo da membrana. A GTP é uma molécula de alta energia, que quando hidrolisada, libera energia que pode ser utilizada.

As hélices da dinamina, promovem, na presença de GTPase, a constrição do pescoço da vesícula em formação. Para que a dinamina quebre a membrana, a tensão da membrana é necessária. A fissão da membrana ocorre se a tensão da membrana for baixa [Pucadyil, Schmid 2008; Dar, Kamerkar, Pucadyil 2015; Antony, Burd et al., 2016]. O termo endocitose mediado por clatrina, vem do fato da proteína clatrina ser o componente chave, contudo mais de 50 outras proteínas estão envolvidas na formação da capa que envolve a vesícula [Traub 2011;

Weinberg, Drubin 2012]. Após o revestimento ter se formado, uma rede de filamentos de actina polimerisa no sítio endocítico, formando um módulo de actina [Kaksonen, Roux 2018]. A actina é a principal proteína de filamentos e constitui cerca de 20-25% da proteína do músculo. Sintetizada como uma proteína globular de 42 KDa (G-actina) se agrega para formar a actina fibrosa (F-actina). Cada G-actina contém sítios específicos, entre os domínios, para o ATP e um metal divalente. O complexo G-actina-ATP-Mg²⁺ agrega rapidamente para formar a F-actina. Muitas proteínas adaptadoras endocíticas são recrutadas à membrana plasmática pela ligação com fosfatidilinositol -4,5- bisfosfato (PI-4,5-P2) sendo esta interação necessária para a formação e função do revestimento endocítico [Antonescu, Aguet et al., 2011; Zoncu, Perera et al., 2007].

Fosfoinosítideo é o termo usado para descrever os fosfoinositóis fosforilados. Entre as isoformas de fosfoinosítideos, o fosfatidilinositol-3-fosfato (PI-3-P), o fosfatidilinositol-4-fosfato (PI-4-P), o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI-4,5-P2) e o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI-3,4,5-P3), parecem desempenhar papéis na endocitose. Contudo, o papel desempenhado pelo PI-4,5-P2 é descrito como ser o mais importante, tanto quanto as proteínas endocíticas como adaptadores e dinamina, os quais ligam especificamente ao PI-4,5-P2 [Di Paolo, De Camilli 2006; Mc Mahon, Boucrot 2011].

O fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato que está concentrado na membrana plasmática participa em quase todo o evento que ocorre ou envolve a superfície celular [Di Paolo, De Camilli 2006]. Duas enzimas catalisam a hidrólise do PI-4,5-P2, a fosfolipase e a fosfatase. A clivagem pelas fosfolipases fornecem produtos que propagam e amplificam a sinalização, enquanto a desfosforilação pela fosfatase controla o nível do PI-4,5-P2 e interrompe o processo de sinalização. Por exemplo, durante a endocitose, a desfosforilação remove o PI-4,5-P2 das membranas internalizadas restringindo sua localização [Cremona, Di Paolo et al., 1999]. Outro destino do PI-4,5-P2 é a conversão para fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato (PI-3,4,5-P3), por quinases (por exemplo PI-3-quinase) [Cantley, 2002; Czech 2003], sendo de importância fisiológica, mediando a proliferação, a diferenciação, a migração e alterações metabólicas [Cantley 2002; Czech 2003]. A remodelação da membrana endocítica durante a maturação do “buraco” revestido de clatrina (*clathrin-coated pits*) requer a conversão de PI-4,5-P2 para PI-3,4-P2. Para isso há inicialmente a hidrólise do PI-4,5-P2 na posição 5 realizada por uma fosfatase, seguida da fosforilação do PI-4-P na posição 3, por uma kinase [Posor, Eichhorn-Gruenig et al., 2013].

Diferentes efetores proteicos requisitadas para a fase de internalização da endocitose, tem um domínio ENTH (*Epsin-N-terminal homology*), ANTH (*AP180-N-terminal homology*) ou PH (*pleckstrin homology*) que interage especificamente com o PI-4,5-P2 [Di Paolo, De Camilli 2006; Itoh, Takenawa 2002; De Craene, Bertazzi et al., 2017]. O PI-4,5-P2 tem um papel importante em todas as formas de endocitose, como um correceptor para o recrutamento e regulação de proteínas endocíticas seletivamente a membrana plasmática [Wenk, De Camilli 2004; Owen, Collins, Evans 2004]. Outras ações do PI-4,5-P2 na endocitose reflete seus efeitos sobre a actina citoesquelética, que está implicada em todas as vias de internalização [Engqvist-Goldstein, Drubin 2003]. O processo endocítico dependente de clatrina, começa no local cujo material deve ser internalizado. As estruturas de clatrina crescem inicialmente planas e quando atingem 70% do conteúdo de clatrina, inicia-se a transição plana para curva e essa transição é diretamente ligada a tensão da membrana plasmática e correlacionada com alterações na taxa de AP2/clatrina [Bucher, Frey al., 2018]. Contudo, é preciso ter em mente, que qualquer interferência com a máquina endocítica, pode ativar novas vias ou então causar uma regulação nas vias anteriores, de modo a desempenhar um papel menor [Damke, Baba et al., 1995].

ENDOCITOSE INDEPENDENTE DE CLATRINA

Uma variedade de vias endocíticas, que não utilizam a clatrina, são responsáveis pela absorção pelas células de partículas grandes ou solutos pequenos, juntamente com a membrana. Estas vias incluem, fagocitose, processo pelo qual, moléculas grandes são internalizados sendo a captação mediada por “caveolae” e macropinocitose. “Caveolae” são invaginações de membrana, em forma de frascos, presentes em muitos tipos de células, que estão implicadas na transcitose e endocitose de componentes sanguíneos [Nichols, Lippincott-Schwartz 2001]. Bioquimicamente, as “caveolae” são caracterizadas por sua associação com uma família de proteínas ligadoras de colesterol, chamada caveolina, que funciona para criar ou manter estas estruturas [Kurzchalia, Parton 1999; Fra, Williamson et al., 1995].

Muitos receptores de membrana, moléculas de sinalização e transportadores de membrana, localizam-se nas caveolae, o que sugere que eles podem atuar como um centro de atividade de sinalização dentro das células, além de seu papel na endocitose [Ceresa, Schmid 2000]. O relato de que a “caveolae” contém um elemento chave da maquinaria envolvida na formação do broto vesicular, a GTPase dinamina, sugere sua participação na internalização da membrana [Henley, Krueger et al., 1998; Oh, McIntosh, Schnitzer 1998]. A fissão de “caveolae” da membrana plasmática em vesículas livres, de transporte livres é mediada por dinamina e GTP [Henley, Krueger et al., 1998; Oh, McIntosh, Schnitzer 1999]. No entanto a extensão da endocitose caveolar em células não endoteliais, in vivo, não está bem claro e isto pode ser um processo não muito freqüente [Kurzchalia, Parton 1999]. “Caveolae” parecem ser estruturas bem estáveis, com outras funções que não a endocitose, porém, evidências sugerem que sua função depende do tipo de célula [Sandvig, Kavaliauskiene, Skotland 2018]. Poucos dados existem a respeito da organização de marcadores para as vias de endocitose independente de clatrina dentro da membrana plasmática, no entanto, parece que estes marcadores, têm sido encontrados nas chamadas balsas lipídicas (*lipid rafts*). As balsas lipídicas são regiões da membrana plasmática resistentes a detergentes e ricas em colesterol, glicosfingolipídeos, proteínas ancorando glicofosfatilinositol e algumas proteínas de membrana [Simons, Ikonen, 1997; Brown, London 1998].

DEGRADAÇÃO DA INSULINA

Em 1981, Goldstein e Livingston sugeriram que a degradação da insulina ocorria dentro da célula. Estudos posteriores mostraram que a degradação da insulina era dependente de sua ligação ao seu receptor, acreditando-se que sua degradação era realizada em compartimento intracelular [Goldstein, Livingston 1981]. A enzima que degradava a insulina foi identificada e denominada “*insulin degrading enzyme*” IDE (enzima degradadora de insulina) [Yokono, Imamura et al., 1980; Yonezawa, Yokono et al., 1986]. A enzima degradadora de insulina (IDE) é uma enzima classificada como metalopeptidase dependente de grupo tiol (-SH) e zinco (Zn), apresentando uma estrutura primária altamente conservada e expressa em tecidos humanos [Becker, Roth 1992; Kurochkin, Guarnera, Berezowsky 2018; Fernandez Gamba, Leal et al., 2009; Sbardella, Tundo et al., 2018]. Localizada preferencialmente no citossol das células, a IDE foi demonstrada em várias organelas como endossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria [Hamel, Mahoney, Duckworth 1991; Hamel, Bennet et al., 2001; Udrisar, Wanderley et al., 2005; Cesar Vieira, Saraiva et al., 2011; Leissring, Farris et al., 2004].

A maior parte da degradação da insulina ocorre nos endossomos e membrana plasmática, mas outros estudos apontam, também como local de degradação da insulina a mitocôndria [Hare 1978; Desautels, Goldberg 1982; Camberos, Perez et al., 2016]. Além de atuar sobre a insulina, a IDE (insulinsina), também atua sobre outros hormônios como a amilina e glucagon,

sugerindo que a IDE contribui para a regulação do metabolismo de carboidratos. O glucagon, como já vimos em capítulos anteriores é um hormônio produzido pelas células alfa do pâncreas, e a amilina é produzida pelas células beta pancreáticas e secretada após ingestão de nutrientes e contribuindo para o controle do peso corporal e homeóstase da glicose. Ela reduz ao mesmo tempo o esvaziamento gástrico e a secreção posprandial de glucagon [Duffy, Lutz, Boyle 2018; Lutz 2006]. Se de um lado a IDE é considerada um contribuinte importante na homeóstase da insulina, a insulina também contribui para a manutenção dos níveis de IDE. A maior expressão de IDE no fígado e rins de ratos indica uma correlação dos níveis de IDE e o catabolismo da insulina [Bondy, Zhou et al., 1994]. Localizando-se principalmente no citossol, a IDE representa um enigma, uma vez que o citossol não parece ser a principal localização de substratos reconhecidos de IDE, em particular a insulina [Hersh 2006].

Várias publicações apontam o papel regulador da enzima degradadora de insulina no sistema ubiquitina-proteossomo, UPS (*Ubiquitin-Proteasome System*) [Sbardela, Tundo et al., 2015; Hamel, Bennet, Duckworth 1998; Grasso, Lanza et al., 2015]. O sistema ubiquitin-proteossomo é responsável pela degradação de proteínas não lisossômicas, desempenhando um papel chave no controle da qualidade proteica e regulação do metabolismo celular [Glickman, Ciechanover 2002; Tomko, Hochstrasser 2013; Schmidt, Finley 2014]. O proteossomo é um complexo proteolítico composto por uma partícula 20S abrigando o sítio ativo proteolítico coberto por uma ou duas partículas 19S. É uma proteína proteolítica dependente de ATP, responsável pela degradação de proteínas que são marcadas para a degradação por ubiquitinação. A ubiquitina é uma proteína monomérica de 76 resíduos de amino-ácidos, presentes em organismos eucariotes, que se liga por covalência a proproteína marcando-as para serem degradadas. A remoção seletiva de proteínas da superfície de membrana serve como um amplo mecanismo para controlar o processamento celular, restando o processo de sinalização a partir dos receptores ou reduzindo o transporte de metabolitos para a célula. Estas proteínas que devem ser removidas precisam ser reconhecidas e esse reconhecimento é feito pela ubiquitinação [Piper, Lehner 2011]. A ubiquitinação ocorre através de uma ativação sequencial de uma cascata de reações catalisada por três enzimas (enzima E1 que requer ATP, enzima E2 e enzima E3) resultando numa ligação covalente com a proteína a ser degradada.

BIBLIOGRAFIA GERAL

Devlin TM (editor) *Textbook of Biochemistry; clinical correlations*. 7th edition, John Wiley Sons, New Jersey, USA. 2010.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (editors) *Biochemistry*. 5th edition W.H. Freeman and Company, New York, USA. 2002.

Voet D, Voet JG (editors) *Biochemistry*. 2nd edition John Wiley & Sons, New York, USA

Nicolau J (editor) *Fundamentos de Bioquímica Oral*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 2008

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW 2002. Structural and function of the type 1 insulin like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57: 1050-93.

Ahmed SBM, Prigent SA 2017. Insights into the Shc family of adaptor proteins. *J Mol Signal* 12: 2, 1-17 DOI. ORG 10.5334/1750-2187-12-2.

- Alessi DR, Cohen P 1998. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Gen Dev* 8: 55-62.
- Algenstaed P, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR 1997. Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca-ATPase in muscle and heart. *J Biol Chem* 272: 23696-702.
- Antonescu CN, Aguet F, Danuser G, Schmid SL 2011. Phosphatidylinositol-4-5- biphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization and size. *Mol Cell Biol* 22: 2588-600.
- Antony B, Burd C, De Camilli P, Chen E et al., 2016. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *Embo J* 35: 2270-84.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME et al., 1994. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of IRS-1 gene. *Nature* 372: 186-90.
- Argetsinger LS, Hsu GW, Myers MG Jr et al., 1995. Growth hormone interferon gamma and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 270: 14685- 92.
- Arneth B, Arneth R, Sham M 2019. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes. *Int J Mol Sci* 20: 2467. Doi 10.3390
- Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE et al., 1992. Phosphatidylinositol-3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 11: 3469-79.
- Ballotti R, Kowalski A, White MF, Le Marchan-Brustel Y, van Obberghen E. 1987. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of its receptor beta-subunit in intact rat hepatocytes. *Biochem J* 241: 99-104.
- Beattie EC, Howe CI, Wilde A, Brodoki FM, Mobley WC 2000. NGF signals through TrKA to increase clathrin at the plasma membranes and enhance clathrin mediated membrane trafficking. *J Neurosci* 20: 7325- 33.
- Becker AB, Roth RA 1992. An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3835-9.
- Bergeron JJ, Posner BI, Josefberg Z, Sikstron R 1978. Intracellular sites for insulin and human growth hormone in Golgi fraction from the liver of female rats. *J Biol Che*, 253: 4058-66.
- Bergeron JJ, Cruz J, Kahn MN, Posner BI 1985. Uptake of insulin and other ligands into receptor-rich endocytic components of target cells. The endosomal apparatus. *Annu Rev Physiol* 47: 383-403.
- Bitsikas V, Correa IR Jr, Nichols BJ 2014. Clathrin independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *eLife* 3: e 03970.
- Bondy CA, Zhou T, Chin E et al., 1994. Cellular distribution of insulin degrading enzyme gene expression. Comparison with insulin and insulin like growth factor receptors. *J Clin Invest* 93: 966-73.

Bouzakri K, Zachrisson A, Al Khalili L et al., 2006. siRNA based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt-2 and IRS-2/Akt-1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metab* 4: 89-96.

Brown DA, London E 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-36.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ et al., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-68.

Bucher D, Frey F, Sochacki KA et al., 2018. Clathrin-adaptor ratio and membrane tension regulate the flat-to-curved transition of the clathrin coat during endocytosis. *Nature Commun* 9: 1109 DOI 10.1038/s 41467-018-13533-0.

Burks DJ, Pons S, Towery H et al., 1997. Heterologous pleckstrin homology domain do not couple IRS-1 to the insulin receptor. *J Biol Chem* 272: 27716-21.

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE 2003. Two new substrates in insulin signaling IRS-5/ DOK 4 and IRS-6/ DOK-5. *J Biol Chem* 278: 25323-30.

Camberos MC, Perez AA, Passicot GA et al., 2016. II insulin processing in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 48: 469-82.

Cantley LC, Auger KR, Carpenter B et al., 1991. Oncogenesis and signal transduction. *Cell* 64: 281-302.

Cantley LC 2002. The phosphoinositide-3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-7.

Carpentier JL, Gorden F, Anderson RG et al., 1982. Colocalization of 125-I epidermal growth factor and ferritin- low density lipoprotein in coated pits: A quantitative electron microscopic study in normal and mutant human fibroblast. *J Cell Bio* 95: 73-7.

Ceresa BP, Schmid SL 2000. Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 12: 204-10.

Cesar Vieira JSB, Saraiva KLA, Barbosa MCL et al., 2011. Effect of dexamethasone and testosterone treatment on the regulation of insulin degrading enzyme and cellular changes in ventral prostate after castration. *Int J Exp Pathol* 1365: 1-9.

Colins LR, Ricketts WA, Yeh L, Cheresch D 1999. Bifurcation of cell migratory and proliferative signaling by adaptor protein. *J Cell Biol* 147: 1561-8.

Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Luthi A et al., 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99: 179-88.

Croll TI, Smith BJ, Margretts MB et al., 2016. Higher resolution structure of the human insulin receptor ectodomain: multi modal inclusion of the insert domain. *Structure* 24: 469-76.

Cuatrecasas P 1971. Insulin receptor interaction in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1264-8.

- Czech MP 2003. Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol* 65: 791-815.
- Damke H, Baba T, van der Blik AM, Schmid SL 1995. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature sensitive mutant dynamin. *J Cell Biol* 131: 69-80.
- Dar S, Kamerkar SC, Pucadyil TJ, 2015. A high throughput platform for real time analysis of membrane fission reactions reveals dynamin function. *Nat Cell Biol* 17: 1588-96.
- Daumke O, Roux A, Haucke V 2014. BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell* 156: 882-92.
- De Craene JO, Bertazzi DL, Friant S 2017. Phosphoinositides, major actors in membrane trafficking and lipid signaling pathways. *Int J Mol Sci* 18: 634; doi 10.3390/ijms 18030634.
- De Meyts, Whittaker J 2002. Structural biology of the insulin and IGF-1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 1: 769- 83.
- De Meyts P 2004. Insulin and its receptor: structure, sensitive to amylin function and evolution. *Bioessays* 26: 1351-62.
- Denley A Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE 2003. The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: A review. *Horm Metab Res* 35: 778-85.
- Desautels M, Goldberg A 1982. Demonstration of an ATP dependent vanadate sensitive endo protease in the matrix of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 257: 1673-9.
- Di Paolo G, De Camilli P 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443: 651-7.
- Duckworth WC 1988. Insulin degradation: mechanisms, products and significance. *Endocrine Rev* 9: 319-43.
- Duffy S, Lutz TA, Boyle CN 2018. Rodent models of leptin receptor-deficiency are less sensitive to amylin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* doi 10.1152/ajpregu. 00179.2018.
- Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG 2003. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 287-332.
- Fantin VR, Sparling JD, Slot JW et al., 1998. Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 273: 10726- 32.
- Fehlmann M, Carpentier JL, Le Cam A et al., 1982. Biochemical and morphological evidence that the insulin receptor is internalized with insulin in hepatocytes. *J Cell Biol* 93: 82-7.
- Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB 1994. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell* 79: 199-209.
- Fernandez-Gamba A, Leal MC, Morelli L, Castanho EM 2009. Insulin degrading enzyme: structure function relationship and its possible role in health and disease. *Curr Pharm Des* 15: 3644-55.

Fra AM, Willianson E, Simons K, Parton RG 1995. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP-21 caveolin. *Proc natl Acad Scin USA* 92: 8655-9.

Glickman MH, Ciechanover A 2002. The ubiquitin proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-428.

Goh LK, Sorkin A 2013. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: e 017459.

Goldstein BJ, Livingston JN 1981. Insulin degradation by insulin target cells. *Metabolism* 30: 825-35.

Gorden F, Carpentier JL, Cohen S, Orci L 1978. Epidermal growth factor. Morphological demonstration of binding, internalization and lysosomal association in human fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5025-9.

Grasso G, Satriano C, Milardi D 2015. A neglected modulator of insulin degrading enzyme activity and conformation: the pH. *Biophys Chem* 203-204: 33-40.

Grasso G, Lanza V, Malgieri G et al., 2015. The insulin degrading enzyme activates ubiquitin and promotes the formation of K48 and K63 ubiquitin. *Chem Commun (Camb)* 51: 15724-7.

Green A, Olefsky JM 1982. Evidence for insulin induced internalization and degradation of insulin in rat adipocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 427-31.

Hamel FG, Mahoney MJ, Duckworth MC. 1991. Degradation of intra endosomal insulin by insulin degrading enzyme without acidification. *Diabetes* 40: 436-43.

Hamel FG, Bennett RG, Duckworth WC 1998. Regulation of multicatalytic enzyme activity by insulin and insulin degrading enzyme. *Endocrinology* 139: 4061-6.

Hamel FG, Bennett RG, Upward JL, Duckworth WC 2001. Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes. *Endocrinology* 142: 2702-6.

Hare T 1978. A novel proteinase with mitochondrial membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 1206-15.

Hedo JA, Kasuga M, van Obberghen E, Roth J, Kahn CR 1981. Direct demonstration of glycosylation of insulin receptor subunits by biosynthetic and external labeling: evidence for heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4791-5.

Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141: 85-9.

Hersh LB 2006. The insulysin (insulin degrading enzyme) enigma. *Cellular Mol Life Sci* 63: 2432-4.

Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. 1996. A Grb2-associated docking protein in EGF-and Insulin receptor signaling. *Nature* 379: 560-4.

- Huang C, Khovorova A, Marshall W, Sorkin A 2004. Analysis of clathrin mediated endocytosis of epidermal growth receptor by RNA interference. *J Biol Chem* 279: 16657-61.
- Huang C, Thirone AC, Huang X, Klip A 2005. Differential contribution of insulin signaling and glucoseuptake in 16 myotubes. *J Biol Chem* 280: 19426-35.
- Itoh T, Takenawa T 2002. Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signaling. *Cell Signal* 14: 733-43.
- Jones N, Hardy WR, Friese MB et al., 2007. Analysis of a Shc family adaptor protein ShcD/Shc4 that associates with muscle-specific kinase. *Mol Cell Biol* 27: 4759-73.
- Kadowaki T, Tamemoto H, Tobe K et al., 1996. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate 1 and identification of insulin receptor substrate 2. *Diabetes Med* 13: S 103-8
- Kahn MN, Savoie S, Bergeron JJ, Posner BI 1986. Characterization of rat liver endosomal fraction. In vivo activation of insulin-stimulable receptor kinase in these structures. *J Biol Chem* 261: 8462-72.
- Kaksonen M, Roux A 2018. Mechanism of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Rev/Mol Cell Biol* 19: 313-26.
- Kurochkin IV, Guarnera A, Berezowsky IN 2018. Insulin degrading enzyme in the fight against Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 39: 49-58.
- Kurzchalia TV, Parton RG 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11: 424-31.
- Lampugnami MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E 2006. Vascular endothelial clathrin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 174: 593-604.
- Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE 1997. The 60 kDa phosphotyrosine protein in insulin treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272: 11439-43.
- Lavin DP, White MF, Brazil DP 2016. IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia* 59: 2280-91.
- Leissring MA, Farris W, Wu X et al., 2004. Alternative translation initiation generates a novel isoform o insulin degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem J* 383:439-46.
- Lemmon MA, Ferguson KM 1996. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85: 621-4;
- Lotti LV, Lanfranccone L, Migliaccio E et al., 1996. Shc proteins are localized on endoplasmic reticulum membranes and are redistributed after tyrosine kinase-receptor activation. *Mol Cell Biol* 16: 1946- 54.

- Lutz TA 2006. Amylinergic control of food intake. *Physiol Behav* 89: 465-71.
- Massague J, Pilch P, Czech MP 1981. A unique proteolytic cleavage site on the beta subunit of the insulin receptor. *J Biol Chem* 256: 3182-90.
- McGlade J, Cheng A, Pelicci G et al., 1992. Shc protein are phosphorylated and regulated by v-Shc and V-Pfs protein tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8869-73.
- Mc Kern NM, Laurence MC, Streltsov VA et al., 2006. Structure of the insulin receptor ectodomain homodimer reveals an unexpected folded-over arrangement of the N and C terminal halves. *Nature* 443: 218-31.
- Mc Mahon HT, Boucrot E 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 517-33.
- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S et al., 1999. The p66Shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402: 309- 13.
- Myers MG Jr, Grammer TC, Brooks J et al., 1995. The pleckstrin homology domain in insulin receptor substrate-1 sensitizes insulin signaling. *J Biol Chem* 270: 11715-8.
- Myers MG Jr, Mendez R, Shi P et al., 1998. The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J Biol Chem* 273: 26908- 14.
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11: 406-12.
- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer TE 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141: 101-4.
- Orsini F, Migliaccio E, Moroni M et al., 2004. The life span determinant p66 Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates transmembrane potential. *J Biol Chem* 279: 25689-95.
- Owen DJ, De Camilli BM, Evans PR 2004. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 153-91.
- Pang DT, Sharma BR, Shafer JA, White MF, Kahn CR 1985. Predominance of tyrosine phosphorylation of insulin receptors during the initial response of intact cells to insulin. *J Biol Chem* 260: 7131-6.
- Pawson T 1995. Proteins modules and signaling networks. *Nature* 373: 573-80.
- Piper RC, Lehner PJ 2011. Endosomal transport via ubiquitination. *Trends Cell Biol* 21: 647-55.
- Platanias LC, Colamonici OR 1992. Interferon alpha induces rapid tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of its receptor. *J Biol Chem* 267: 24053- 7.
- Platanias LC, Uddin S, Yetter A, Sun XJ, White MF 1996. The type-1 interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-2. *J Biol Chem* 271: 278-82.

- Posor Y, Eichhorn-Gruenig M, Puchkov D et al., 2013. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature* 499: 233-37.
- Posner BI, Patel B, Verma HK, Bergeron JJ 1980. Uptake of insulin by plasmalemma and Golgi subcellular fractions of rat liver. *J Biol Chem* 255: 735-41.
- Pucadyil TJ, Schmid SL 2008. Real time visualization of dynamin catalyzed membrane fission and vesicle release. *Cell* 135: 1263-75.
- Ravichandran KS 2001. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20: 6322- 30.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Barrett AJ 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acid Res* 36: D 320-5.
- Sadagurski M, Dong XC, Myers MG Jr, White MF 2014. IRS-2 and IRS-4 synergize in non-LepRb neurons to control energy balance and glucose homeostasis. *Mol Metab* 3: 55-63.
- Sandvig K, Kavaliauskiene S, Skotland T 2018. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem Cell Biol* Doi 10.1007/s00418-018-1678-5.
- Sato K, Kimoto M, Kakumoto M et al., 2000. Adapter protein Shc undergoes translocation and mediates up regulation of the tyrosine kinase cSrc in EGF-stimulated A 431 cells. *Genes Cells* 5: 749- 64.
- Sbardella D, Tundo GR, Sciandra F et al., 2015. 26S proteasome activity is affected by fluctuations in insulin degrading enzyme distribution. *PLoS one* 10: e013245.
- Sbardella D, Tundo GR, Colleta A et al., 2018. The insulin degrading enzyme is an allosteric modulator of the 2proteasome and a competitor of the 19S. *Cellular Mol Life Sci* 75: 3441-56.
- Schmidt M, Finley D 2014. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1843: 13-25.
- Schmitz-Peiffer C, Whitehead JP 2003. IRS-1 regulation in health and disease. *IUBMB Life* 55: 367- 74.
- Shptner HS, Vallee RB 1989. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 59: 421-32.
- Siddle K 2012. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol* 3: 34 doi. 10.3389/fendo.2012.00034.
- Siegel TW, Ganguly S, Jacobs S, Rosen OM, Rubin CS 1981. Purification and properties of the human placental insulin receptor. *J Biol Chem* 256: 9266-73.
- Simons K, Ikonen E 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-72.
- Sparrow LG, Gorman JJ, Strike PM et al., 2007. The location and characterization of the O-linked glycans of the insulin receptor. *Proteins* 66: 261-5.
- Smith BJ, Huang K, Kong G et al., 2010. Structural resolution of the tandem hormone binding element in the insulin receptor and its implication for design of peptide agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 6771-6.

Stevenson LE, Ravichandran KS, Frackelton AR Jr 1999. Shc dominant negative disrupts cell cycle progression in both G₀-G₁ and G₂-M of ErbB2 positive breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 10: 61-71.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR et al., 1991. The structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-7.

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y et al., 1995. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* 377: 173-7.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR 2006. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin actions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96.

Thirone ACP, Huang C, Klip A 2006. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 17: 70-6.

Thomas D, Patterson SD, Bradshaw RA 1995. Shc homologous and collagen (Shc) protein binds to F actin and translocates to the cytoskeleton upon nerve growth factor stimulation in PC 12 cells. *J Biol Chem* 270: 28924- 31.

Tomko RJ Jr, Hochstrasser M 2013. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem* 82: 414-45.

Traub LM 2011. Regarding the amazing choreography of clathrin coats. *PLoS Biol* 9, e 1001037. doi 10.1371.

Uddin S, Yenush LP, Sun XJ et al., 1995. Interferon alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidyl inositol 3-kinase. *J Biol Chem* 270: 15938-41.

Udrisar DP, Wanderley MI, Porto RC, Cardoso CLP et al., 2005. Androgen and androgen-dependent regulation of insulin degrading enzyme in subcellular fractions of prostate and uterus. *Exp Biol Med* 230: 479-87.

Ventura A, Maccarana M, Raker VA, Pelicci PG 2004. A cryptic targeting signal induces isoform specific localization of p46 Shc to mitochondria. *J Biol Chem* 279: 2299- 306.

Von Kleist L, Stahlsmidt W, Bulut H et al., 2011. Role of clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* 146: 471-84.

Ward CW, Garrett TP 2004. Structural relationship between the insulin receptor and epidermal growth factor receptor families and other proteins. *Curr Opin Drug Discov Dev* 7: 630- 8.

Ward CW, Lawrence MC, Streltsov VA, Adams TE, Mc Kern NM 2007. The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand induced activation. *Trends Biochem Sci* 32: 129-37.

Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG 1996. The adapter protein Shc couples a class of integrins to the control cell cycle progression. *Cell* 87: 733- 43.

Weinberg J, Drubin DG 2012. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol* 22: 1-13.

Wenk MR, De Camilli P 2004. Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffick: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8262-9.

White MF, Maron R, Kahn CR 1985. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185,000 protein in intact cells. *Nature* 318: 183-6.

White MF, Stegmann EW, Dull JJ, Ulrich A, Kahn CR 1987. Characterization of an endogenous substrate of the insulin receptor in cultured cells. *J Biol Chem* 262: 9769- 77.

White MF, Kahn CR 1994. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269: 1-4.

White MF 2002. IRS proteins and common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E 413-22.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H et al., 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391: 900-4.

Wolf G, Trub T, Ottinger E et al., 1995. PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping specificities. *J Biol Chem* 270: 27407- 10.

Ye L, Maji S, Sanghera N et al. 2017. Structure and dynamics of the insulin receptor: implications for receptor activation and drug discovery. *Drug Discov Today* 7: 1092- 1102.

Yonezawa K, Yokono K, Yaso S et al., 1986. Degradation of insulin by insulin degrading enzyme and biological characteristics of its fragments. *Endocrinology* 118: 1989-96.

Yenush L, Makati KJ, Smith-Hall J et al., 1996. The pleckstrin homology domain is the principle link between the insulin receptor and IRS-1. *J Biol Chem* 271: 24300- 6.

Yenush L, White MF 1997. The IRS signaling system during insulin and cytokine actions. *Bioessays* 19: 491-500.

Yokono K, Imamura Y, Shii K et al., 1980. Immunochemical studies on the insulin-degrading enzyme from pig and rat skeletal muscle. *Diabetes* 29: 856-9.

Yonezawa K, Yokono K, yaso S et al., 1986. Degradation of insulin by insulin-degrading enzyme and biological characteristics of its fragments. *Endocrinology* 118: 1989-96.

Zoncu R, Perera RM, Sebastian R et al., 2007. Loss of endocytic clathrin coated pits upon acute depletion o phosphatidylinositolo-4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3793-8.

CAPÍTULO 5. - ESTRESSE OXIDATIVO

Quando nos deparamos com a expressão estresse oxidativo, a primeira coisa que nos vem à mente é a pergunta: o que é estresse oxidativo? Para responder a essa indagação, vamos recorrer a alguns relatos de pesquisadores. De acordo com Sies, estresse oxidativo é um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, levando potencialmente a lesão, [Sies, Berndt, Jones 2017]. Opara, define estresse oxidativo da seguinte forma: estresse oxidativo é geralmente descrito como uma situação desbalanceada em que níveis excessivos de radicais livres de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio ROS, (*Reactive Oxygen Species*) estão presentes no corpo devido, a uma inadequada disponibilidade de substâncias neutralizantes de relevância, referidos como antioxidantes, os quais destroem esses produtos nocivos do processo metabólico [Opara 2006]. Por outro lado, Lushchak, define estresse oxidativo da seguinte maneira: estresse oxidativo é uma situação, quando a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) do equilíbrio dinâmico (*steady state ROS concentration*) é transitória ou cronicamente intensificada, perturbando o metabolismo celular e sua regulação, lesionando os constituintes celulares [Lushchak 2011].

Do acima exposto sobre estresse oxidativo, podemos entender por estresse oxidativo, como sendo a produção excessiva de radicais livres, cuja neutralização total não é conseguida pela defesa antioxidante do organismo, causando, por conseguinte, danos celulares. Essas definições apresentadas, nos remetem as seguintes referências: (1) radicais livres são normalmente formados no organismo em decorrência do metabolismo; (2) esses radicais livres ou espécies reativas de oxigênio são substâncias nocivas ao organismo e (3) o organismo procura se defender produzindo agentes antioxidantes.

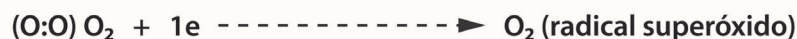
RADICAIS LIVRES

Embora descritos há mais de um século, os radicais livres, em virtude de sua alta reatividade e tempo muito curto de vida, durante algum tempo, não foram considerados pelos pesquisadores, estarem presentes em sistemas biológicos [Lushchak 2014]. Contudo, essa situação começou a se modificar a partir da década de 1950, quando os radicais livres foram descritos em sistemas biológicos [Commoner, Townsend, Pake 1954], o que levou os pesquisadores a se interessarem pelos radicais livres, considerando-os como participantes de diversos processos biológicos [Gerschman, Gilbert et al., 1954], bem como, também, desempenhando um papel no envelhecimento [Harman 2009]. A partir de então, com a intensificação das pesquisas, os radicais livres passaram a ser melhor conhecidos.

A pergunta que se segue é: o que são radicais livres? Para que possamos entender o que são radicais livres vamos recordar um pouco de química. As moléculas que formam as substâncias são constituídas por átomos. Átomos, são sistemas complexos constituídos de um número de partículas, que carregam cargas positivas, negativas ou então neutras. Essas partículas estão distribuídas no centro do átomo, chamado núcleo e em camadas ao redor do núcleo, chamado eletrosfera. No núcleo estão concentradas as partículas com carga positiva, chamados prótons e partículas neutras chamados nêutrons. Na eletrosfera, girando aos pares em torno do núcleo, em camadas ou órbitas, estão as partículas de carga negativa, chamadas elétrons. Os átomos dos elementos são compostos de número e proporções diferentes dessas partículas. A distinção entre um elemento de outro, baseia-se na sua constituição em prótons, nêutrons e elétrons. Os prótons com sua carga positiva, identificam o átomo, que é conhecido como número atômico. A massa do átomo é representada pelas partículas dispostas no núcleo, isto é, prótons e nêutrons. As órbitas são preenchidas pelos elétrons em ordem crescente de energia. Um átomo estável apresenta o número de prótons igual ao número de elétrons, isto é, a carga positiva do próton anula a carga

negativa do elétron, fazendo com que o átomo seja um sistema eletricamente neutro. A partícula mais leve carregada positivamente tem a mesma massa do átomo de hidrogênio. O átomo de hidrogênio que perdeu um elétron, sobrando uma carga positiva é conhecido como próton.

A reatividade química de um átomo é dependente da conformação de elétrons na última camada. Esta conformação determina a facilidade com que a molécula pode aceitar ou doar elétrons. Quando a molécula tem um átomo com elétrons não pareados (não compartilhados) ou então, número ímpar de elétrons em sua última camada é referido como radical livre, sendo relativamente instável e por conseguinte muito reativo. Assim, o radical mais simples é o hidrogênio, que contém um próton e um elétron. Já o oxigênio molecular (O_2), que tem 2 elétrons não pareados em sua última camada permite aceitar até 2 elétrons (um de cada vez) de outro composto.



Portanto, um radical é definido como uma molécula possuindo um átomo, com um elétron não pareado na última camada (órbita) altamente reativo, que pode iniciar uma reação em cadeia pela remoção de um elétron de outra molécula para completar sua própria órbita. Grande parte das moléculas de um corpo não são radicais e dessa forma qualquer radical livre gerado, pode reagir com moléculas não radicais. Quando isso acontece o resultado é o início de reação em cadeia de radical livre e novos radicais são formados [Halliwell 1994]. Os processos envolvendo ganho ou perda de elétrons ocorrem ao mesmo tempo, isto é, à medida que uma espécie perde elétrons (oxidação) se oxida, enquanto a outra espécie que ganha elétrons (redução) se reduz. Essas reações são conhecidas como reações de óxido redução (ou redox) e uma de suas características é o número total de elétrons doados por uma espécie ser exatamente igual ao número de elétrons recebidos pela outra espécie. Espécies reativas de oxigênio são formas ativas de oxigênio necessárias para várias funções celulares em repouso e em resposta a diferentes estímulos [Magder 2006; Cuzzocrea, Riley et al., 2001; Droge 2002; Valko, Leibfritz et al., 2007]. Entre as espécies reativas mais comuns destacamos: não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), o ozônio (O_3) e óxido nítrico (NO) e entre os radicais livres, o superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o peróxido de lipídeo ($LOO^{\cdot}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o peroxidonitrito ($ONOO^{\cdot}$).

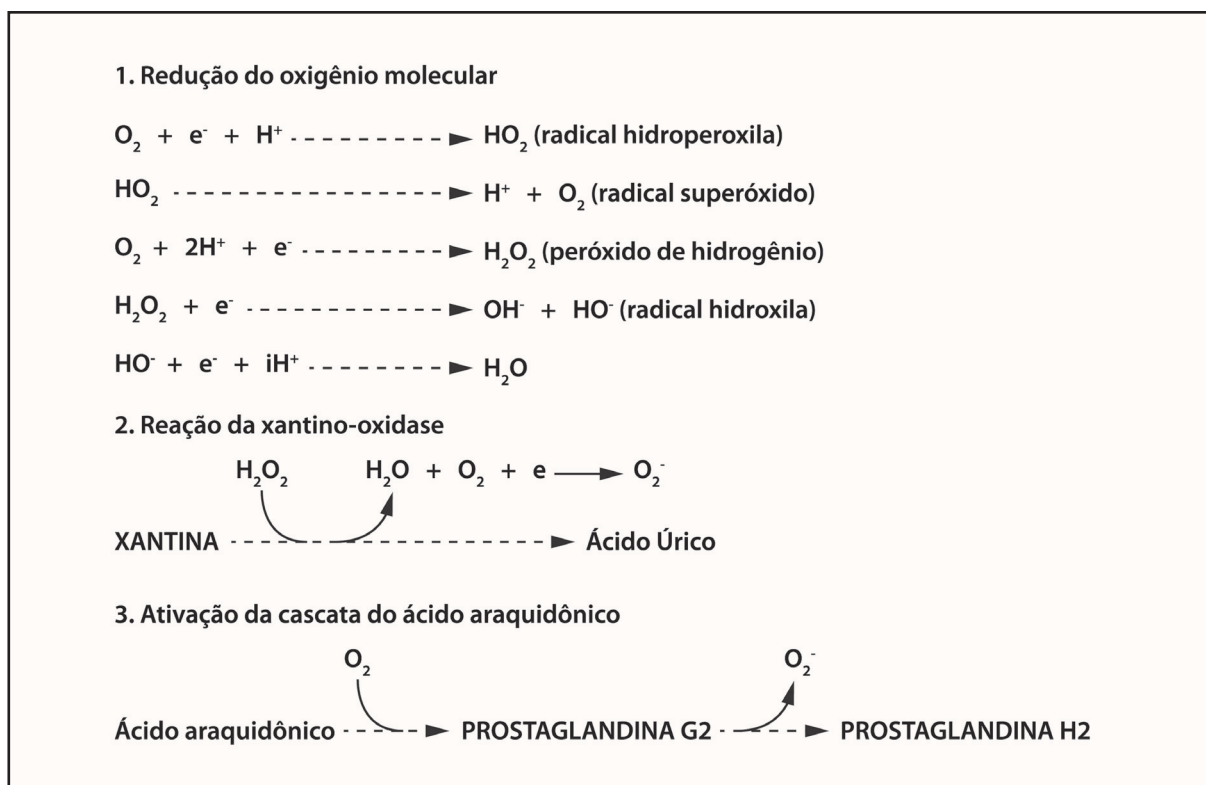
O radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), o oxidante mais reativo, apresenta uma meia vida muito curta, o que faz com ele reaja com muitas moléculas biológicas no local onde é formado. Já o superóxido ($O_2^{\cdot -}$) pode atuar como um oxidante fraco, porém é mais forte como um agente redutor de complexos com ferro como o citocromo C. Provavelmente é mais importante como fonte de radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio [Bettendorge DJ 2000]. O óxido nítrico (NO), um exemplo de radical fisiológico é de considerável interesse, através de seu papel como mediador do tônus vascular [Moncada, Palmer, Higgs 1991]. O campo dos radicais livres ou mais comumente chamados espécies reativas é um dos mais dinâmicos, porém está entre os mais complicados devido a muitas razões. Os principais são: (1) baixa estabilidade e alta reatividade, resultando baixas concentrações no equilíbrio dinâmico; (2) alta diversidade de reações que podem participar; (3) complicada distribuição espaço temporal, tanto no espaço celular quanto extracelular; (4) dependência do estado fisiológico do organismo e (5) ausência de ferramentas técnicas para avaliação confiável de seu nível absoluto e relativo [Halliwell, Gutteridge 1989; Lushchak 2014].

GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

A mitocôndria é uma organela que apresenta alta capacidade antioxidante. Mesmo apresentando alta capacidade antioxidante, publicações frequentemente, descrevem a mitocôndria como a principal fonte de espécies reativas de oxigênio [Zoccarato, Cavallini, Alexandre 2004; Drechsel, Patel 2010; Banh, Treberg 2013]. Evidências experimentais apontam, que cerca de 90% de espécies reativas de oxigênio nos eucariotos são produzidos na mitocôndria [Skulachev 2012; Lushchak 2014]. Desses 90% produzidos, em situações específicas, provavelmente a maior parte é gerada via escape de elétrons da cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória), principalmente da coenzima Q para o oxigênio molecular. Estes elétrons que escapam da cadeia respiratória interagem com o oxigênio molecular para dar o superóxido.

Diferentes processos bioquímicos dentro do corpo dão origem a radicais livres: redução do oxigênio molecular durante a respiração de produtos da cascata de elétrons do ácido araquidônico o qual, pode reduzir o oxigênio molecular a superóxido; produção de ácido nítrico por endotélio vascular e outras células [Betteridge 2000]. Podemos esquematizar a formação de radicais livres como se segue (figura 5. 1).

Figura 5.1 - Esquema de formação de radicais livres



FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES A PARTIR DA CADEIA RESPIRATÓRIA

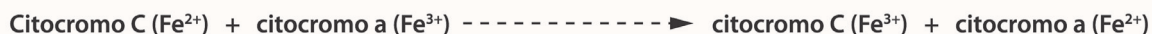
Inicialmente, vamos dar uma idéia do que vem a ser cadeia respiratória.

Entendemos por cadeia respiratória ou cadeia de transporte de elétrons um conjunto de

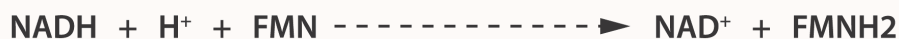
proteínas carregadoras de elétrons, cuja passagem de elétrons, a partir de equivalentes redutores até o receptor final o oxigênio, possibilita a formação de água. Na cadeia respiratória, que ocorre na mitocôndria, há a síntese de ATP (adenosina trifosfato), uma molécula importante que armazena energia necessária para as funções vitais do organismo. A energia necessária para a síntese de ATP é aquela aproveitada da liberação de energia livre da cadeia respiratória, pela passagem de elétrons através de 4 complexos protéicos (complexos I, II, III e IV), do potencial redox mais baixo para o mais alto.

Elétrons são passados dos complexos I e II para o complexo III, via coenzima Q (também conhecido como ubiquinona); do complexo III para o complexo IV, pela proteína C. Os complexos I, III e IV não sintetizam diretamente o ATP, inicialmente há o seqüestro da energia livre liberada e necessária para a síntese de ATP, bem como o bombeamento de prótons para fora da mitocôndria, quando então estabelece um gradiente de pH e o potencial elétrico transmembrana, que cria uma força motriz de prótons.

A formação de ATP, também conhecida como fosforilação oxidativa, como já vimos, resulta graças ao aproveitamento da energia livre liberada durante a transferência de elétrons, dos equivalentes redutores NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e FADH₂ (flavina adenina dinucleotídeo reduzido) para o oxigênio molecular, em três locais da cadeia respiratória. É um processo que ocorre na mitocôndria sendo a principal fonte de ATP nos organismos aeróbicos. Já vimos anteriormente, que processos em que há perda de elétrons (oxidação) ou ganho de elétrons (redução) se realizam concomitantemente, isto é, são conhecidas como reações de óxido-redução. Na cadeia respiratória, em algumas reações de óxido-redução, somente elétrons são transferidos do redutor ao oxidante, é o caso por exemplo da transferência de elétrons entre citocromos:



Contudo, em outras reações, tanto elétrons quanto prótons são transferidos, como ocorre na transferência de elétrons entre NADH e FMN



Um oxidante juntamente com sua forma reduzida, forma um par redox. A facilidade com que um doador de elétrons transfere seus elétrons a um receptor é expresso como potencial redox do sistema. Para que possamos entender a ordem dos intermediários da cadeia respiratória, que transportam elétrons de coenzimas reduzidas ao oxigênio, precisamos conceituar o potencial de redução padrão, uma medida do potencial de transferência de elétrons a um dado composto oxidado. O potencial de redução padrão, designado E_o é a medida da força eletromotriz gerado a 25°C e pH 7,0, por uma meia célula relativamente a uma meia célula de referência. Vejamos, como são determinados os potenciais de redução, usando como exemplo uma amostra de lactato/piruvato (figura 5.2). Já vimos que as reações de óxido-redução envolvem passagem de elétrons de um composto para outro.

Portanto, um fluxo de elétrons em condições apropriadas é uma corrente elétrica. Dessa forma, a voltagem, medida em condições padrão, pode ser determinada para esta reação. Para nossa finalidade, as meias reações de oxido-redução podem ser consideradas separadamente. O fluxo de elétrons é detectado por um potenciômetro. Se uma dada reação for escolhida como referência e sua voltagem potencial padrão ser atribuído o valor zero ($E_o = 0$), a voltagem para a outra meia reação pode ser medida contra a referência. Consideremos a redução do piruvato para lactato, mediado por NADH, como ocorre na fermentação anaeróbica.



As duas meias reações escritas na direção de redução são:

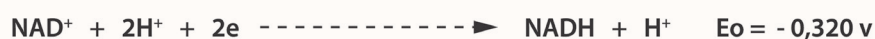
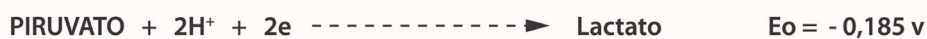
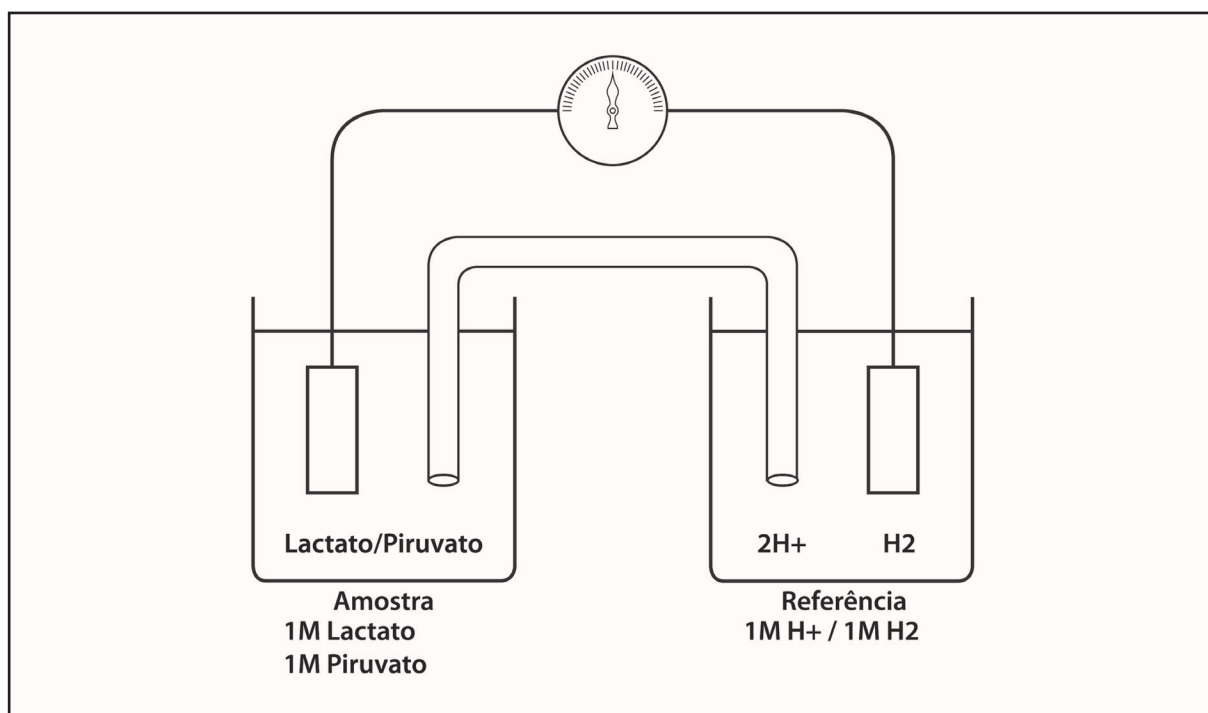


Figura 5.2 - Esquema mostrando como o potencial de redução é determinado usando um potenciômetro

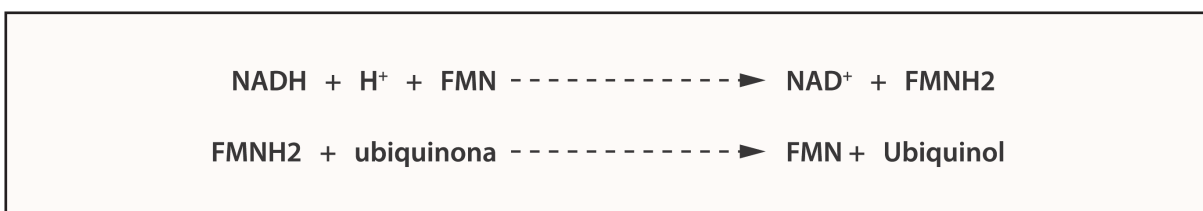


Neste caso, o NADH que apresenta um potencial de redução maior que o do piruvato é o doador de elétrons, enquanto o piruvato é o receptor.

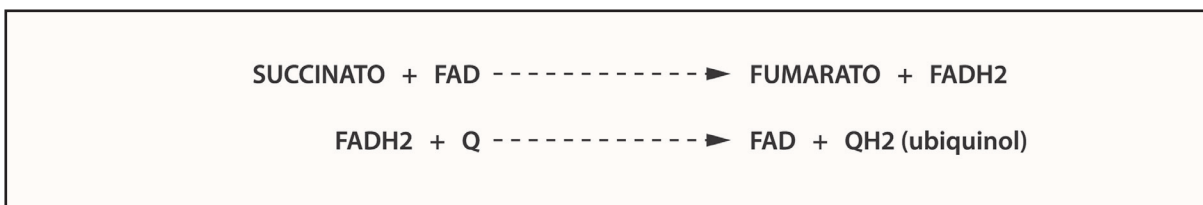
A transferência de elétrons dos equivalentes redutores NADH e FADH_2 na cadeia de transporte de elétrons, ocorre por meio de quatro grandes complexos (complexos I, II, III e IV), os quais catalisam diferentes reações na cadeia respiratória. O complexo I, isto é, NADH-ubiquinona óxido redutase catalisa a transferência de elétrons entre NADH para a coenzima Q (ubiquinona).

Figura 5.3 - Esquema do fluxo de elétrons através dos constituintes da cadeia respiratória

Essa transferência se realiza inicialmente entre NADH e FMN (flavina adenina dinucleotídeo), um dos componentes do complexo I juntamente com proteínas Fe-S (ferro e enxofre) que tomam parte nas reações.



O complexo II, succinato-ubiquinona óxido redutase, ou succinato desidrogenase, catalisa a transferência de elétrons para ubiquinona (Co Q) via FADH₂ (flavina adenina inucleotídeo). Neste complexo também encontramos proteínas Fe-S, que também tomam parte nas reações:



O complexo III, complexo citocromo bc₁ ou ubiquinol-citocromo C redutase, transfere elétrons da ubiquinona (coenzima Q) para citocromo C. Este complexo é constituído por citocromo b, que contém grupo heme e proteína RIESKE Fe-S. Os grupos heme dos citocromos da cadeia respiratória sofrem reações de óxido-redução (Fe²⁺- Fe³⁺), diferentemente dos grupos heme da hemoglobina e mioglobina onde o Fe permanece como ferroso (Fe²⁺). No processo de transferência de elétrons, tanto o ubiquinol quanto o citocromo c são carregadores de elétrons móveis. Proteínas Fe-S constituem uma família de proteínas contendo ferro e enxofre complexados com resíduos de cisteína da proteína. Os átomos de ferro e de enxofre estão presentes na proteína em quantidades equimoleculares (por exemplo 4Fe-4S ou 2Fe-2S). O átomo de ferro no centro dessas proteínas pode ser ou oxidado (Fe³⁺) ou reduzido (Fe²⁺) e são os receptores e doadores de elétrons, quando a proteína que o contém está funcionando como carregadores de elétrons.

A coenzima Q (ubiquinona) é o único componente não protéico da cadeia de transporte de elétrons. É uma benzoquinona com cadeia lateral isoprenoide. As quinonas apresentam 3 estados de oxidação, o estado oxidado, o estado reduzido e o radical semiquinona. A adição de um elétron e um próton resulta na forma semiquinona QH[•]. A forma semiquinona pode ser desprotonada para formar o radical semiquinona Q^{•-}. A adição de um segundo elétron e próton gera a forma reduzida da coenzima (QH₂) o ubiquinol.

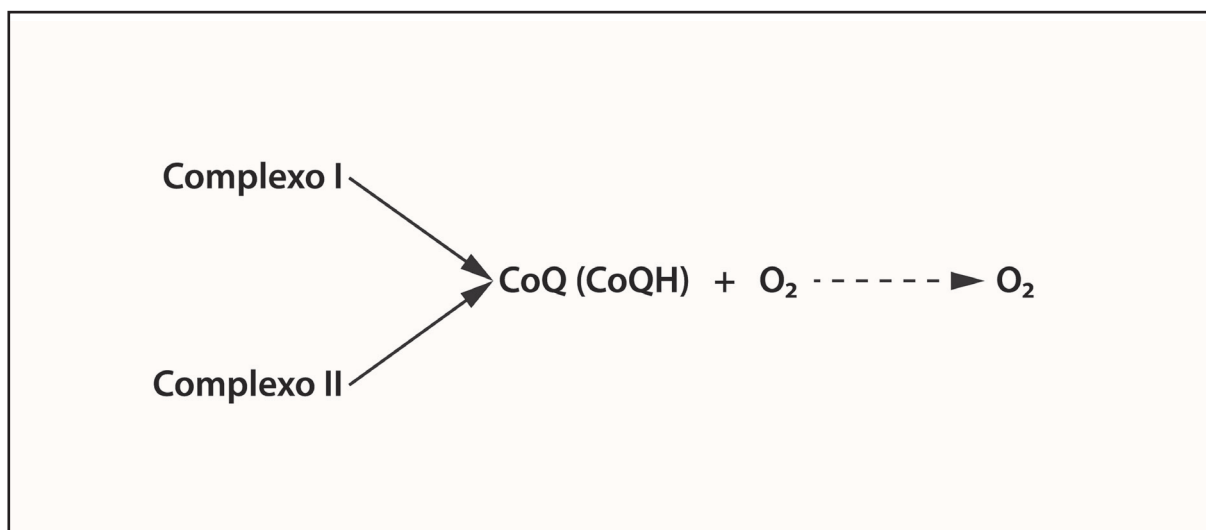
INIBIDORES DA CADEIA RESPIRATÓRIA

A utilização do espectrofotômetro de duplo feixe [Chance, Williams 1955; Chance, Williams 1956], trouxe uma contribuição importante para o entendimento do transporte de elétrons na cadeia respiratória. O espectrofotômetro de duplo feixe significa, que o feixe de luz, antes de passar pela amostra é dividido em dois feixes iguais, um passando pela amostra enquanto o outro passa pelo branco (referência). A intensidade de luz transmitida por cada um, amostra e referência, são automaticamente comparados. Esta técnica, juntamente com os estudos de inibidores específicos, como rotenona, amital, antimicina A, cianeto, azida e monóxido de carbono, foram valiosos para o estabelecimento da sequência dos carregadores de elétrons dispostos na cadeia respiratória. A rotenona, uma substância tóxica, extraída de algumas plantas e o amital, um barbitúrico, inibem a transferência de elétrons no complexo I, isto é, NADH-CoQ oxido redutase, prevenindo a utilização de NADH como substrato.

Já a antimicina A, um antibiótico produzido por *Streptomyces* SP, um agente fungicida e inseticida, interfere com o fluxo de elétrons no complexo III, isto é, CoQ-citocromo C oxido redutase. Além da inibição do transporte de elétrons nos complexos I e III, o complexo IV pode ser bloqueado, por cianeto (CN⁻), azida (N₃). O CN⁻ e a N₃ reagem, com Fe³⁺ do heme do citocromo enquanto o CO reage com Fe²⁺.

As espécies reativas de oxigênio produzidas na mitocôndria incluem o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Durante a transferência de elétrons dos equivalentes redutores para o receptor final, o oxigênio molecular formando água, inevitavelmente, há vazamento de elétrons, os quais reagem com o oxigênio molecular formando um pequeno número de radicais de oxigênio. A primeira evidência, que o radical superóxido é produzido no complexo III, no fluxo de elétrons da coenzima Q para o citocromo C, veio de experimentos com inibidores da cadeia respiratória [Loschen, Azzi, Flohe 1973; Nohl, Gille et al., 1996]. Portanto, admite-se que um dos pontos da cadeia respiratória em que há vazamento de elétrons é no local da passagem de elétrons entre a CoQ e o complexo III, isto é, da forma oxidada da CoQ para a forma reduzida da CoQ, passando pelo intermediário semi-ubiquinona, através dos centros das proteínas Fe-S dos complexos I e II. A semiquinona formada pode transferir um elétron para o oxigênio molecular formando o radical superóxido. A quantidade de elétrons que escapa da cadeia respiratória depende do estado fisiológico do organismo, variando grandemente por isso [Luschak VI 2014].

Figura 5.4 - Formação do superóxido pela coenzima Q durante a transferência de elétrons



O superóxido assim formado sofre um processo de dismutação formando o peróxido de hidrogênio. Dismutação, é um tipo de reação de óxido-redução entre duas moléculas da mesma espécie interagindo, entre si de tal modo que para uma oxidada a outra é reduzida



Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase. Pode ocorrer espontaneamente, porém a reação é muito lenta. Existem 3 enzimas superóxido dismutase (SOD) nos mamíferos: uma SOD citossólica contendo cobre e zinco (Cu-Zn SOD); uma SOD intra mitocondrial contendo magnésio (Mg SOD) e uma SOD extracelular contendo cobre e zinco (Cu- Zn SOD) [Fridovitch I 1995]. Ao lado do superóxido e do peróxido de hidrogênio, forma-se também na mitocôndria o radical hidroxila, muito reativa portanto, a mais danosa, com uma vida média fisiológica de 10-9 segundos [Pryor 1986; Raha, Robinson 2000]. O radical hidroxila é um radical livre, que causa peroxidação de lipídeos, de proteínas e DNA. O peróxido de hidrogênio formado pela ação da superóxido dismutase reage com o íon ferroso formando também o radical hidroxila. Esta reação é conhecida como reação de Fenton.



DISPONIBILIDADE DE EQUIVALENTES REDUTORES PARA A CADEIA RESPIRATÓRIA

Vimos anteriormente, que a maior parte dos radicais livres de oxigênio no organismo são formados na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, durante o funcionamento normal do metabolismo. Os equivalentes redutores NADH e FADH₂ são os principais responsáveis pelo funcionamento da cadeia respiratória. Portanto, nada mais justo do que abordarmos, embora sucintamente, como esses equivalentes ficam disponíveis para movimentar a cadeia de transporte de elétrons. Para isso vamos recordar de forma resumida o metabolismo intermediário.

É bem conhecido o fato de que as funções das células, tecidos ou órgãos dependem da disponibilidade de energia (energia que entendemos como ATP). Dentro das células há uma rede metabólica com funções de fornecer energia e material biossintético (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Aproveitamento da energia de substratos para formação de ATP e ROS

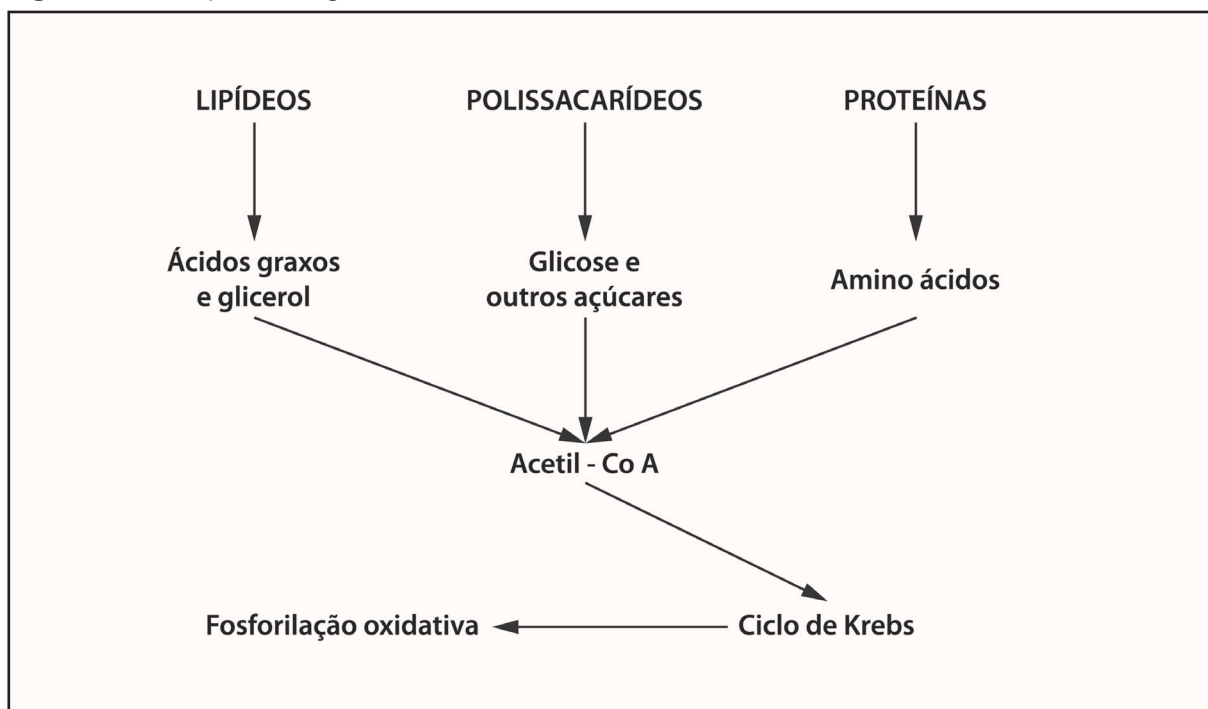


De que forma a célula obtém a energia do sistema ambiental, ou de que forma estas células transformam a energia em trabalho, são processos realizados por reações químicas altamente integradas, conhecidas como metabolismo. O metabolismo intermediário, num sentido mais geral, refere-se aos eventos químicos que ocorrem, desde a ingestão dos alimentos até a excreção dos produtos metabólicos finais. Este conceito relaciona-se com o processo de geração de energia

(ATP) pela oxidação dos alimentos consumidos. A figura abaixo nos dá uma idéia inicial do processo (Figura 5.6).

Krebs descreve três estágios na geração de energia. No primeiro estágio as grandes moléculas, constituintes dos alimentos, são quebradas e reduzidas a unidades menores (Figura 5.6).

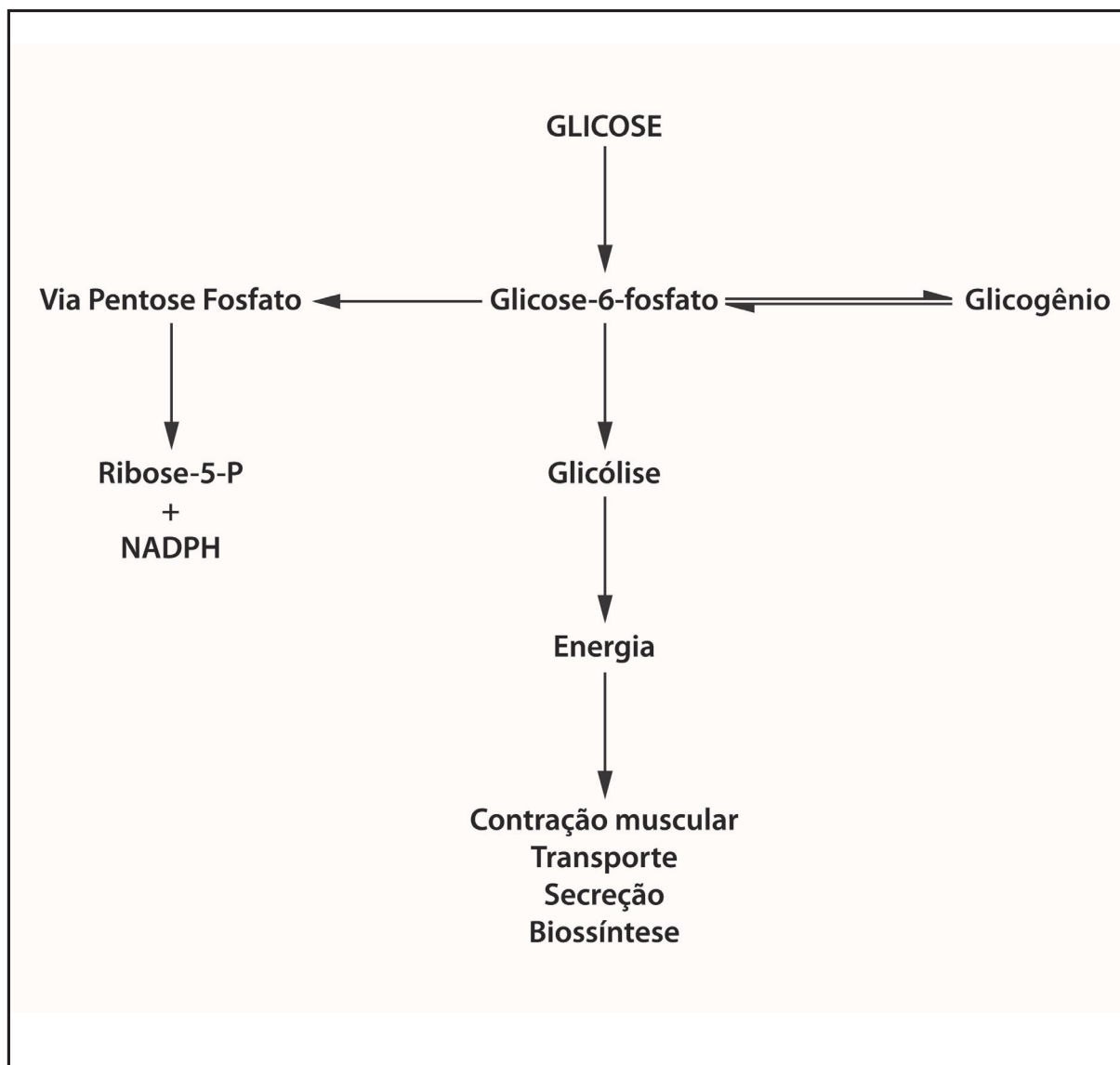
Figura 5.6 - Extração de energia do sistema ambiental



Assim, a proteína é transformada a amino ácidos, os polissacarídeos são hidrolizados a glicose e outros açúcares enquanto os lipídeos são hidrolizados a ácidos graxos e glicerol. Neste estágio não há geração de energia (ATP). No segundo estágio as unidades moleculares menores são aproveitadas para desempenhar um importante papel no metabolismo. Essas unidades mais simples (glicose, ácido graxo e vários aminoácidos) são convertidos a acetil coenzima A (acetil-CoA).

Neste estágio, alguns ATPs (energia) são gerados, porém em pequena quantidade comparados àquela obtida pela oxidação completa da acetil-coenzima A (acetil-CoA). O terceiro estágio consiste no ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico) e da fosforilação oxidativa (cadeia de transporte de elétrons), estágios finais da oxidação das moléculas. A acetil-CoA leva as unidades acetilas para o ciclo de Krebs onde são completamente oxidados. Quatro pares de elétrons são transferidos para o NAD^+ e FAD para cada grupo acetila que é oxidada. O ATP é gerado durante o fluxo de elétrons da cadeia respiratória, a partir das formas reduzidas (NADH e FADH_2) num processo chamado oxidação fosforilativa. A maior parte dos ATPs são formados neste estágio. Essa rede complexa de milhares de reações químicas interdependentes deve ser rigorosamente regulada. Além do mais, o controle metabólico deve ser flexível, uma vez que o ambiente externo das células não é constante.

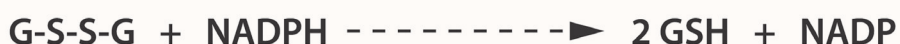
Sem dúvida, o metabolismo da glicose é fundamental para todos os organismos, sendo a principal via de geração de energia (ATP), enquanto os intermediários glicolíticos, também servem de precursores para a biossíntese de outros constituintes celulares. O esquema a seguir mostra como, uma vez dentro da célula, a glicose pode ser utilizada (Figura 5.7).

Figura 5.7 - Vias do aproveitamento de glicose dentro da célula

A enzima responsável pela fosforilação da glicose com produção de glicose-6-fosfato (G-6-P) é a hexoquinase (HK). Existem quatro isoenzimas de hexoquinase, I, II, III e IV (glicoquinase), expressas de forma específica nos tecidos. As isoenzimas I, II e III, apresentam alta afinidade pelo substrato a glicose, isto é, apresentam baixo K_m , o que significa que não precisam de alta concentração de glicose para funcionarem. Essas isoenzimas são inibidas pelo seu produto a G-6-P. As células parenquimais do fígado e as células beta do pâncreas possuem a isoenzima IV (glicoquinase), com propriedades diferentes. A glicoquinase possui um K_m alto, isto é, apresenta baixa afinidade ao substrato, o que significa que é preciso alta concentração de glicose para ela atuar. As bases para surgir essa hipótese, vieram de vários trabalhos ao longo do tempo. Os relatos de que a glicose abaixava o potencial de membrana das células beta e induzia atividade elétrica [Dean, Matthews 1970; Meissner, Schmelz 1974], foi um passo importante para entender como a atividade da glicoquinase poderia estar acoplada a liberação de insulina. Por meio de modelos computacionais foi possível mostrar como o aumento da concentração de glicose, via aumento da concentração de G-6-P pela atividade da glicoquinase, aumento do estado energético celular e diminuição das concentrações da ADP e AMP, levou os autores a

considerar a glicoquinase um sensor da glicose, apoiando a hipótese de que a glicoquinase é responsável pelo acoplamento, concentração de glicose e secreção de insulina, pelas células pancreáticas [Matschinsky, Wilson 2019].

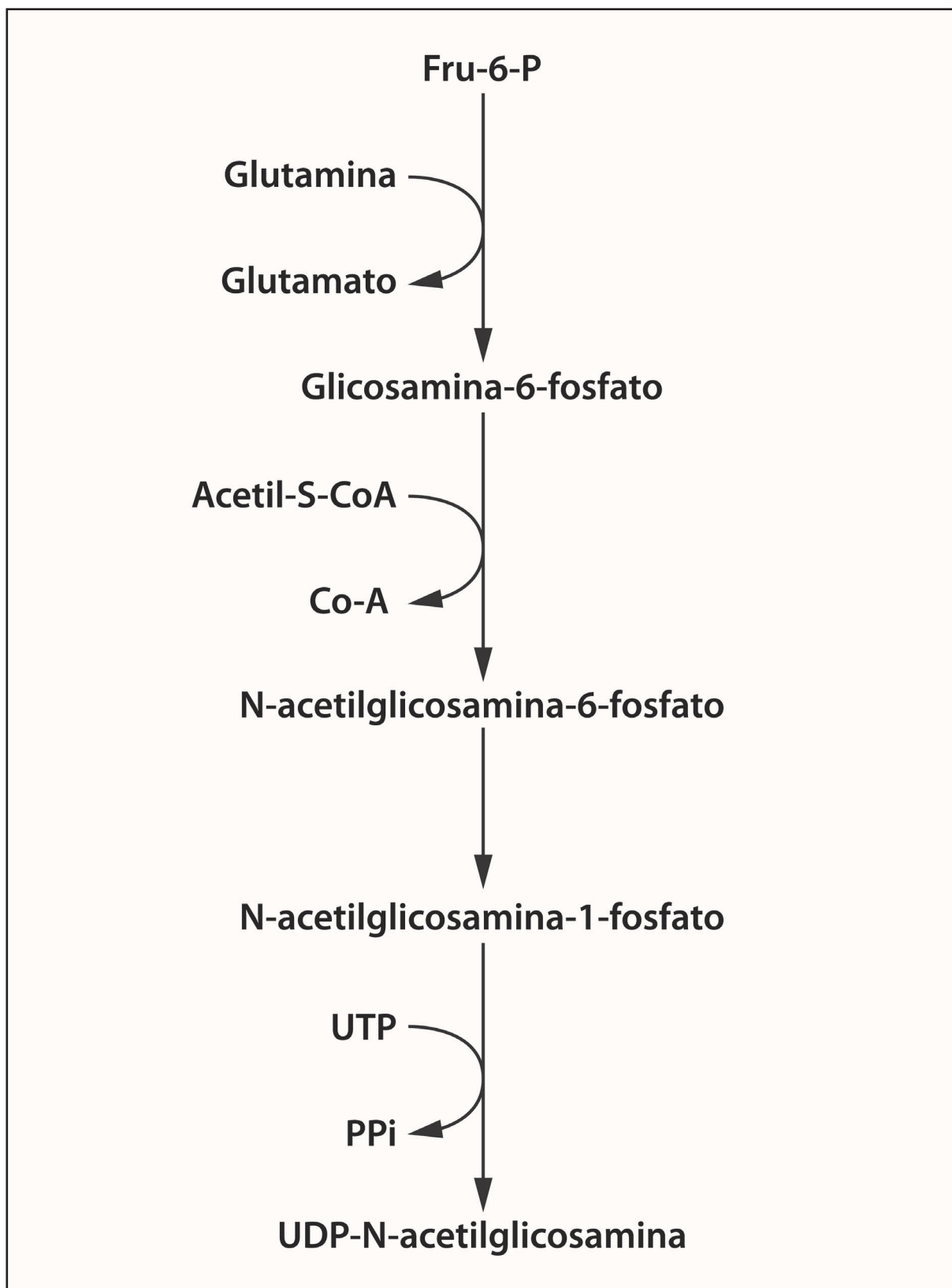
Uma vez formado, a G-6-P pode ser direcionada a três vias metabólicas conhecidas, isto é, ela pode sofrer um processo de isomerização para glicose-1-fosfato e ser utilizada para a síntese de glicogênio, pode sofrer o processo de isomerização a frutose-6-fosfato e seguir a via glicolítica ou pode sofrer oxidação a 6-fosfogluconato para a via pentose fosfato. A via que leva para a síntese de glicogênio é importante, por ser esse polissacarídeo uma reserva energética importante. A outra via que a G-6-P pode seguir é a via pentose fosfato, uma via que direciona o fluxo de glicose para seu ramo oxidativo e leva a produção da forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), importante nas reações de oxido-redução e de ribose-5-fosfato, necessária para a síntese de ácidos nucléicos. É o que acontece, por exemplo, nos eritrócitos em que o NADPH é usado para reduzir a glutatona oxidada (G-S-S-G), para a glutatona reduzida (GSH). A glutatona reduzida é importante para manter a estrutura normal dos glóbulos vermelhos e a hemoglobina no estado ferroso (Fe^{2+}).



A glicose-6-fosfato desidrogenase é a enzima importante para via pentose fosfato. Há relatos de um aumento do nível de G-6-PD no crescimento celular seja o normal ou neoplásico [Kletzien, Harris et al. 1994; Frederiks, Vizán et al., 2008; Tian, Braunstein et al., 1998; Jin, Zhou 2019]. Evidências apontam, que o aumento da atividade da G-6-PD é essencial para prevenir a morte celular mediado pelo ROS [Tian, Braunstein et al., 1999].

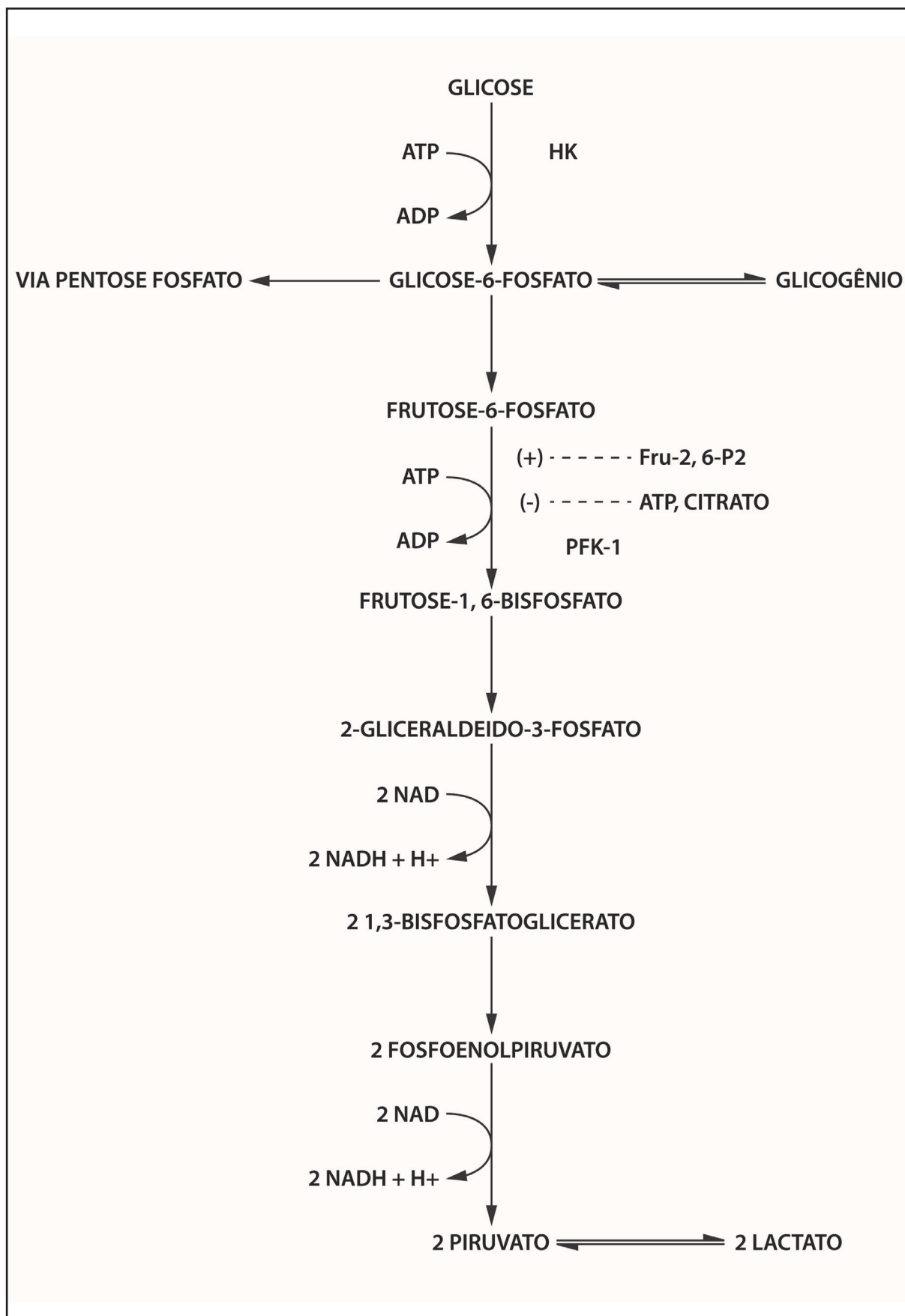
Por outro lado, parece que a G-6-PD é importante para o funcionamento normal do sistema cardiovascular. A deficiência da G-6-PD está relacionada a uma significativa redução na proliferação celular de células endoteliais [Leopold, Walker et al., 2003]. A terceira via à qual a G-6-P pode ser direcionada é a via glicolítica. A G-6-P formada pela ação catalisadora da enzima hexoquinase, pela ação de uma isomerase forma a frutose-6-fosfato (Fru-6-P), a qual pode seguir a via glicolítica ou a via das hexosaminas, para formar a uridinadifosfato-N-acetilglicosamina, importante por fornecer grupos N-acetil glicosamina para os processos de glicosilação de proteínas, pela enzima UDP-N-acetil glicosamina transferase [Yki-Jarvinen, Vogt et al., 1997]. A Fru-6-P é transformada a glicosamina-6-fosfato, numa reação com glutamina e catalisada pela enzima glicosamina-6-fosfato sintetase, com formação, também, de glutamato. A glicosamina-6-fosfato sofre um processo de acetilação, reagindo com acetil-CoA e catalisada pela enzima glicosamina-6-fosfato acetil transferase, formando a N-acetilglicosamina-6-fosfato e liberando a Co-A. A N-acetilglicosamina-6-fosfato por uma ação de isomerase é convertida ao isômero N-acetilglicosamina-1-fosfato, o qual pela ação da N-glicosamina-1-fosfato uridil transferase forma o uridinadifosfato N-acetil glicosamina [Thoden, Wohlers et al., 2000; Adeva-Andany, Perez-Felpete et al., 2016]. A seguir esquematizamos a via das hexosaminas até a formação da uridinadifosfato-N-acetil glicosamina, participante do processo de glicosilação de proteínas (Figura 5.8).

Figura 5.8 - Formação da uridina difosfato-N-acetilglicosamina (UDP-N-acetilglicosamina)



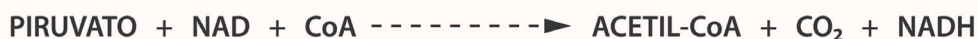
Por outro lado, a Fru-6-P pode seguir a via glicolítica. Neste caso, a enzima fosfofrutoquinase-1 é fundamental para efetivar a via que leva a formação de piruvato, lactato e acetil-Co A.

Figura 5.9 - Via glicolítica mostrando as reações enzimáticas onde são consumidos ou gerados energia (ATP), bem como os locais de estímulo e inibição



Para podermos entender o caminho tomado pela glicose até a produção de energia no transporte de elétrons mitocondrial, vamos esquematizar as etapas da glicólise anaeróbica (Figura 5.9). A glicólise ocupa uma posição central no metabolismo energético, preenchendo a demanda de energia pelas células, através da produção de NADH e ATP e gerando glicerol-3-fosfato para a síntese de fosfolípidos e triglicerídeos, bem como produzindo piruvato, que é convertido a acetil-CoA para utilização no ciclo de Krebs ou para a biossíntese de novo de ácido graxo [Jenkins, Yang et al., 2011]. A glicose-6-fosfato formado pela reação da enzima hexoquinase, segue então a via glicolítica para formar o piruvato. O piruvato que é formado na via glicolítica, dependendo das necessidades das células, pode ser convertido a lactato, alanina, oxalato ou acetil-coenzima A. O efeito Warburg, que ocorre nas células cancerosas, permite que o NAD utilizado na passagem do gliceraldeído-3-fosfato para 1,3-bisfosfato glicerato, pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase seja rapidamente regenerado, pela reação da enzima lactato desidrogenase, que transforma o piruvato em lactato, capacitando dessa forma a sobrevivência celular em ambientes hipóxicos, em razão da reduzida dependência da fosforilação oxidativa e do aumento de intermediários biossintéticos glicolíticos para manter a biossíntese de macromoléculas [Gatenby, Gillies 2004].

A conversão de piruvato para acetil-CoA ocorre na mitocôndria, numa reação catalisada por um complexo multienzimático, a piruvato desidrogenase (PDH).



A localização do complexo PDH era considerada somente mitocondrial, porém evidências apontam sua presença no núcleo celular, onde funciona produzindo acetil-CoA, que serve de substrato para a acetilação de histonas [Sutendra, Kinnaird et al., 2014].

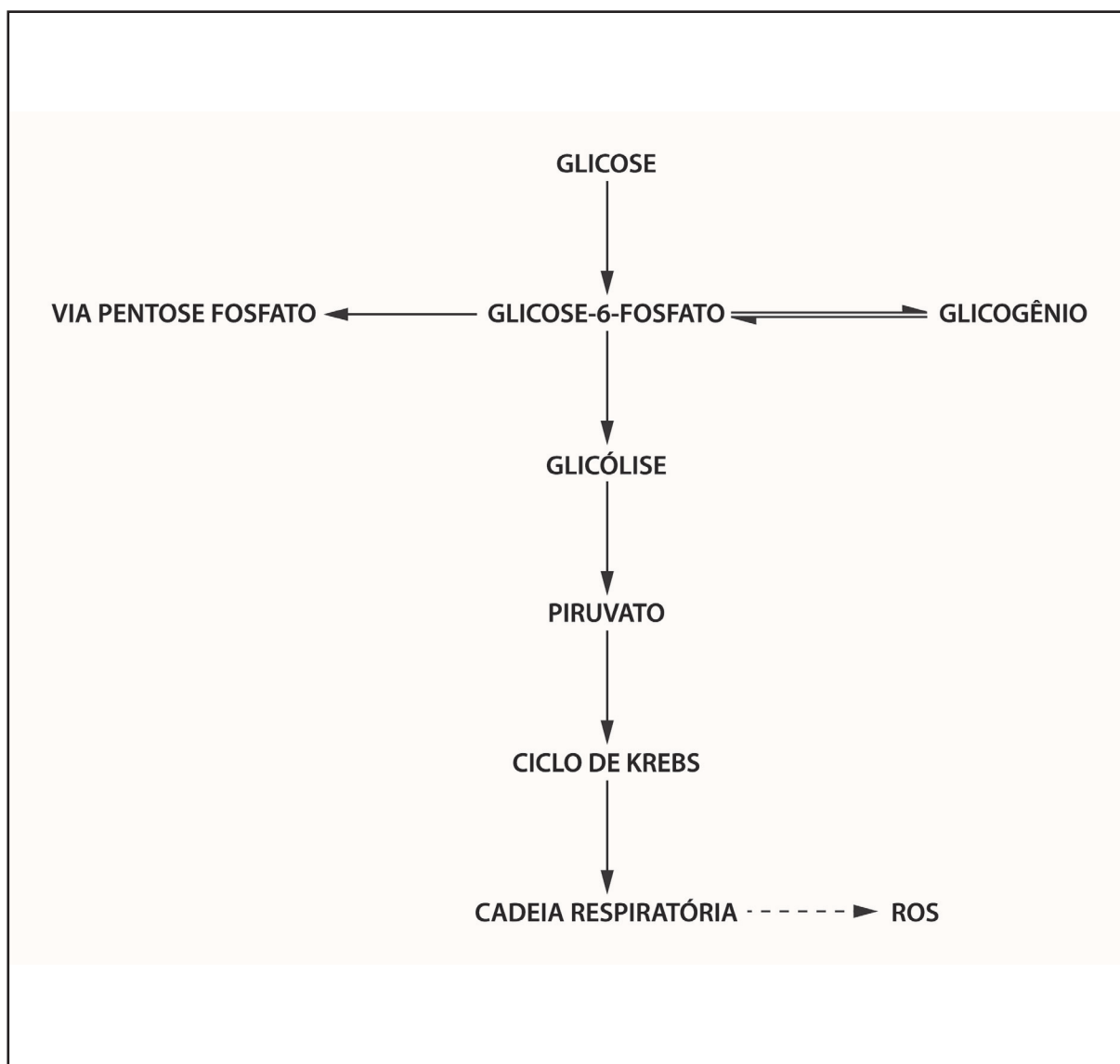
A deficiência da atividade do complexo mitocondrial dependente de NADH e fosforilação oxidativa são características de falha sistólica do coração [Stanley, Recchia, Lopaschuk 2005]. Um diagnóstico de deficiência do complexo PDH de forma geral, resulta de defeito na subunidade piruvato descarboxilase, em virtude de mutação ligada ao gene [Sheeran, Angerosa et al., 2019]. Essa deficiência resulta em acidose láctica congênita, em virtude do piruvato ser convertido a acetil-CoA numa taxa reduzida, possibilitando, dessa forma uma maior quantidade do piruvato ser aproveitado pela lactato desidrogenase formando lactato [Verschuere, Blanzhet et al., 2019].

Nas ilhotas pancreáticas são relatadas três isoformas de piruvato desidrogenase [Sugden, Bulmer et al., 2001; Xu, Han et al., 2006]. A deficiência específica de PDH nas células beta (beta-PDHKO) leva a uma concentração reduzida de insulina diminuindo sua secreção estimulada pela glicose, demonstrando um papel chave da PDH na secreção de insulina estimulada pela glicose [Snirivasan, Choi et al., 2010].

O ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo de Krebs é a principal etapa final comum as vias para oxidação de carboidratos, lipídeos e alguns amino-ácidos, onde são produzidos equivalentes redutores (NADH e FADH₂). Os equivalentes redutores contribuem diretamente para a cadeia de transporte de elétrons, onde se verifica a produção de energia (ATP), bem como também, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). O ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos pode ser dividido em dois estágios: 1. descarboxilação, em que um composto com 6 átomos de carbono (citrato) é convertido a outro composto com 4 átomos de carbono (suocinil-CoA) liberando duas moléculas de gás carbônico (CO₂); 2. estágio de redução, onde são formados os equivalentes redutores que alimentam a cadeia de transporte de elétrons. O esquema a seguir (Figura 5.10) nos dá uma idéia de como a glicose, uma vez na célula possibilita a formação de equivalentes redutores, que movimentam a cadeia respiratória onde as espécies reativas

de oxigênio se formam. Intermediários do ciclo de Krebs podem deixar o ciclo para serem aproveitados para biossíntese de outros compostos. O citrato pode ser desviado para a síntese de ácidos graxos, o α -cetoglutarato para a síntese de amino ácidos, a succinil-CoA para a síntese de heme. É um processo conhecido como cataplerose. Por outro lado, compostos podem ser inseridos no ciclo. Por exemplo, o piruvato pode entrar no ciclo pela piruvato carboxilase, que a transforma a oxalacetato; o glutamato pode entrar via α -cetoglutarato; o aspartato via succinato. O processo é conhecido como anaplerose. Aproximadamente metade da glicose metabolizada na mitocôndria, via piruvato, nas células beta do pâncreas, entram no ciclo de Krebs através da enzima piruvato desidrogenase, enquanto a outra metade entra através da via anaplerótica, pela enzima piruvato carboxilase [MacDonald 1995; Schuit, De Vos et al., 1997; Cline, Lepine et al., 2004].

Figura 5.10 - Esquematização do aproveitamento de glicose pela célula liberando energia que é aproveitada para síntese de ATP e formação de equivalentes redutores, bem como também de ROS



Além da piruvato carboxilase outra via anaplerótica é a da glutamato desidrogenase que converte glutamato em α -cetoglutarato [Cline, Lepine et al., 2004].

RELAÇÃO ÓXIDO NÍTRICO E SUPERÓXIDO

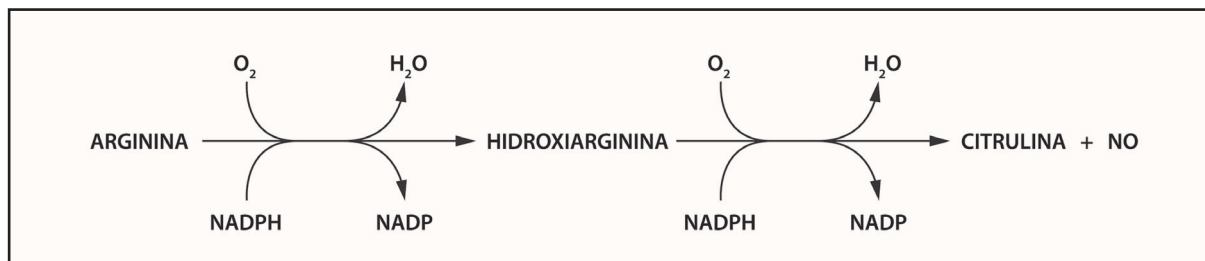
O óxido nítrico é uma molécula pequena, neutra e hidrofóbica, que pode atravessar a membrana celular para exercer suas funções. No entanto, sua difusão é limitada pelo fato de ser uma molécula altamente reativa, reagindo rapidamente com a oxihemoglobina (HbO₂):



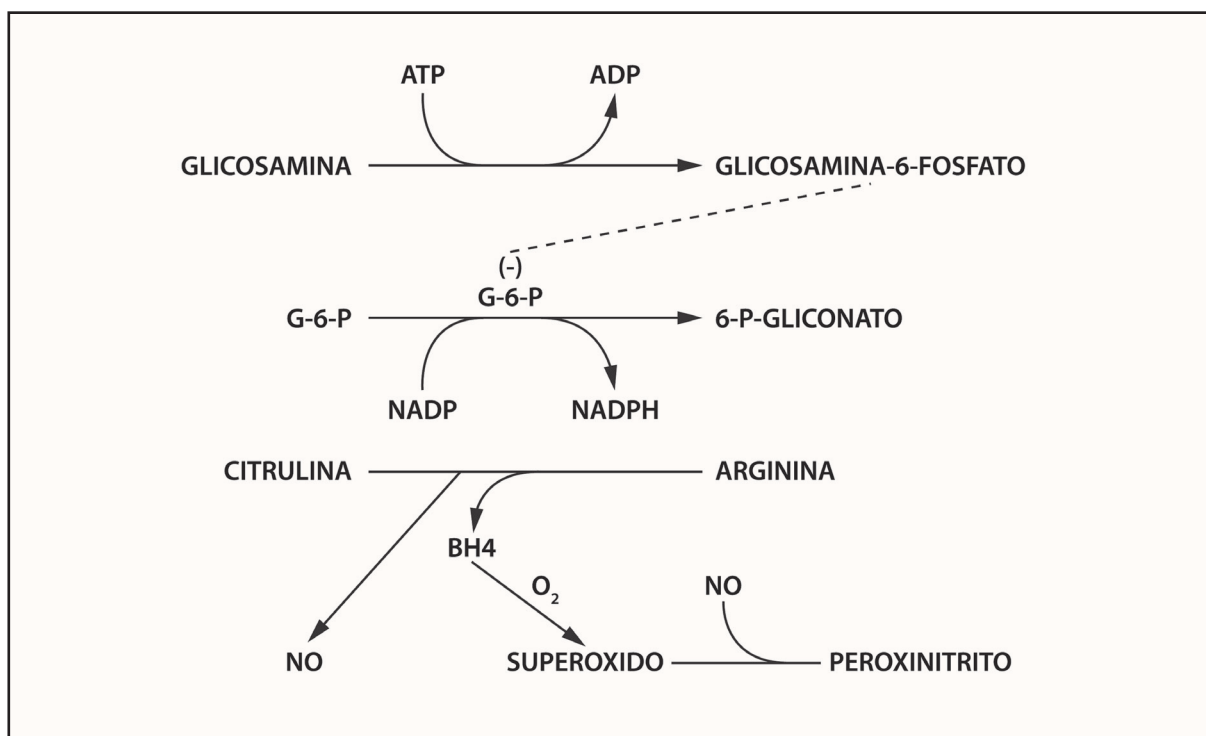
O óxido nítrico causa inibição reversível do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons ao se ligar ao grupo heme da citocromo oxidase. A intensificação dos níveis de NO que chegam à mitocôndria causam uma disfunção dessa organela por meio dos seguintes eventos: (1) inibição reversível do complexo IV da cadeia respiratória; (2) vazamento de elétrons e formação de superóxido (O₂⁻); (3) formação de peroxidonitrito; (4) oxidação e nitração dos complexos I e II inativando-os. Essa sequência de eventos contribui para as alterações no gradiente eletroquímico mitocondrial, redox e homeostase bioenergético bem como abertura dos poros de permeabilidade [Radi 2018]. Uma família de metaloenzimas contendo o grupo heme, chamado óxido nítrico sintase, NOS (nitric oxide synthases) são as responsáveis pela produção de óxido nítrico. Três isoenzimas foram identificadas em humanos, que diferem na distribuição tecidual e regulação na atividade. A isoforma endotelial eNOS (NOS-3) localiza-se no citoplasma e membrana plasmática. A isoforma nNOS (NOS-1) está presente no citoplasma, mitocôndria e membrana plasmática. NOS-1 e NOS-3 são constitutivamente expressos e são ativados pelo cálcio. A isoforma iNOS (NOS-2), é uma enzima citossólica, sendo induzível por citocinas inflamatórias e lipopolissacarídeos, encontrada em macrófagos e hepatócitos [Stuehr, Santolini et al., 2004; Jobgen, Fried et al., 2006]. As enzimas NOS são proteínas homodiméricas cujas subunidades apresentam um peso molecular de 120 a 160 KDa, homóloga a citocromo P450 oxidase, uma enzima envolvida no processo de detoxificação. Cada subunidade contém FMN, FAD e um tetrahipterina.

O ácido nítrico é sintetizado através da via arginina-NO, numa reação onde se forma citrulina (Figura 5.11). A enzima ativada por cálcio-calmodulina (Ca-CaM) catalisa a oxidação dependente de oxigênio de L-arginina a citrulina, numa reação de óxido redução que utiliza o NADPH como agente redutor.

Figura 5.11- Formação de óxido nítrico via reação catalisada pela NOS



A síntese reduzida de NO, que ocorre, por exemplo, na obesidade, a partir da arginina até citrulina, na reação catalisada pela NOS se deve a deficiência do cofator que é essencial para que a reação se processe, o tetrahipterina [Meninger, Marinos et al., 200], bem como na geração de glicosamina a partir da glicose e glutamina [Wu, Haynes et al. 2001].

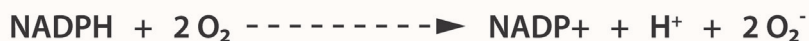
Figura 5.12 - Relação entre glicosamina, síntese de NO e peroxinitrito

O aumento da produção de glicosamina-6-fosfato acarreta a inibição da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), reduzindo por conseguinte a produção de NADPH, fator essencial na reação catalisada pela NOS, possibilitando dessa forma a formação de superóxido e peroxidinitrito. O superóxido além de diminuir a biodisponibilidade de NO, gera também o radical peróxidonitrito, um potente oxidante, biologicamente ativo [Beckman, Beckman, Chen et al., 1990]. O peroxidinitrito (OONO) tem uma meia vida curta, porém pode reagir diretamente com vários alvos biológicos como metais, tiois e gás carbônico. Ele tem sido implicado em diferentes patologias como desordens, inflamatórias, aterosclerose, hipertensão, moléstias degenerativas e pulmonares, câncer e o processo de envelhecimento [Pacher, Beckman, Liaudet 2007].

NADPH OXIDASE

As enzimas NOX-1, NOX-2 e NOX-3, que são ativadas de uma forma aguda podem ser classificadas como grupo 1. Esses NOX dependem da associação das subunidades ligadas a membrana com proteínas citossólicas [Schroder, Weissmann 2017]. O segundo grupo consiste das enzimas NOX-5, DUOX-1 e DUOX-2 e são independentes de fatores citossólicos e apresentam um domínio (mão EF) que facilita a percepção de Ca^{2+} . O NOX-5 produz principalmente o superóxido, enquanto os outros produzem o superóxido e o peróxido de hidrogênio [Schroder 2020]. O terceiro grupo tem como membro o NOX-4, que não requer a subunidade citossólica e é ativado de uma forma característica [Takac, Schroder et al., 2011].

As enzimas NOX são capazes de transferir elétrons, que são fornecidos pelo NADPH, através de membranas biológicas. Esses elétrons passando as membranas através das subunidades de NOX, são transferidos para o oxigênio molecular gerando o ânion superóxido (O_2^-). Esse ânion superóxido pode ser liberado sem modificação ou então protonado sob a forma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [Schroder 2020]. As enzimas NOX catalisam a reação entre o NADPH (forma reduzida) com o oxigênio molecular formando o NADP^+ (forma oxidada) e o superóxido:



Essas enzimas ocorrem em fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos). Um pequeno grupo de enzimas que produzem o superóxido, são também encontradas no endotélio, rins e baço, onde produzem quantidades pequenas do superóxido [Babior 2004]. A dismutação do superóxido gerado produz o peróxido de hidrogênio numa reação catalisada pela enzima superóxido dismutase [Fridovich 1995]. Dismutação refere-se à transferência de um elétron ao oxigênio:



IMPLICAÇÕES DO NAD E METABOLISMO

Vimos anteriormente, que a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) desempenha um papel importante para o fluxo das vias metabólicas. Portanto, nada mais justo do que abordarmos um pouco essa molécula. O NAD⁺ é um cofator essencial que serve para modular vários processos biológicos, incluindo o metabolismo, reparo de DNA, envelhecimento e expressão gênica [Canto, Menzies, Auwerx 2015; Magni, Amici et al., 2004; Fang, Lautrup et al., 2017]. A concentração do NAD⁺ nas células é alta, por volta de 0,2 – 0,3 mM e isto, ao lado de seu papel no metabolismo energético, levanta a questão de sua analogia ao ATP. Tanto o NAD⁺ quanto o ATP são utilizados para realizar trabalhos, acoplando várias vias metabólicas (anabólicas e catabólicas), ao lado de atuarem como doadores ou aceptores para modificação covalente de proteínas os quais posteriormente regulam o metabolismo e a sinalização celular [Chini, Tarrago, Chini 2017]. O NAD⁺ bem como sua forma fosforilada NADP⁺ e as formas reduzidas NADH e NADPH atuam como coenzimas aceptoras e doadoras de elétrons e hidrogênio. Coenzima é uma molécula não protéica, contendo geralmente uma vitamina, que toma parte numa reação enzimática. Tais reações não são destrutivas, no sentido de que o NAD⁺ (oxidado) e o NADH (reduzido) são interconvertidos pela transferência de hidrogênio. O NAD⁺ é um metabolito sensor de energia. As vias sensoras de energia são importantes para a manutenção de um equilíbrio entre a produção e o consumo de energia. O NAD⁺ funciona como um cofator oxidoreductase, modulando as atividades de vias compartimentais, como glicólise no citossol, ciclo de Krebs, fosforilação oxidativa e oxidação de ácidos graxos na mitocôndria [Sirover 1999; Srivastava 2016]. A meia vida do NAD⁺ dentro das células é curta (1-2 horas) e sua distribuição nos compartimentos é desigual, sendo maior na mitocôndria em relação aos outros compartimentos [Alano, Tran et al., 2007; Pirinen, Canto et al., 2014].

Sendo uma coenzima, os níveis de NAD influenciam diretamente as vias metabólicas. Seus níveis diminuem com o estado nutricional como obesidade e idade [Yoshino, Mills et al., 2011; Choi, Fu et al., 2013]. O NADH é o principal doador de elétrons à cadeia de transporte de elétrons e o potencial redox um indicador importante do estado energético das células [Canto, Menzies, Auwerx 2015; Connel, Houtkooper, Schrauwen 2019]. Os estados redox NADH/NAD⁺ e NADPH/NADP⁺ tanto do citosol quanto da mitocôndria são fortemente conectados. Estes

estados energéticos dependem da formação do NAD (oxidado) a partir do NADH (reduzido) de processos que ocorrem nas células como glicólise, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons [Houtkooper, Canto et al., 2010], exemplificando a essencialidade e seu potencial redox dentro do metabolismo celular [Connel, Houtkooper, Schrauwen 2019]. A concentração de NAD⁺ celular é regulada pelo equilíbrio entre os processos de síntese e de consumo. O NAD⁺ pode ser sintetizado através de três vias, a via de salvação, a via de novo e a via de Preiss–Handler, em que são usados a nicotinamida, o triptofano e o ácido nicotínico respectivamente [Badaway 2017]. Em células de mamíferos o NAD⁺ é sintetizado predominantemente pela via da salvação. Esta via é assim chamada quando um intermediário da degradação de uma biomolécula é reusado para a síntese daquela molécula, enquanto a via de novo envolve a síntese de uma biomolécula a partir de precursores pré-formados, sem entrarmos em muitos detalhes, nessa via, a nicotinamida que se origina da degradação do NAD⁺ por enzimas, que consomem este cofator é transformada a nicotinamida mononucleotídeo (NMN) pela enzima nicotinamida fosforibosil transferase. O NMN por sua vez é conjugado ao ATP sendo convertido a NAD⁺ pela enzima NMN adenililtransferase [Berger, Lau et al., 2005].

A síntese de NAD⁺ via de novo a partir do triptofano pode ser resumida da seguinte forma: primeiramente o triptofano é transformado a N-formil-quinurenina, pela ação da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO). Uma vez formada, a N-formil-quinurenina, através de uma série de reações enzimáticas é convertida a ácido quinolínico. Este é transformado ao ácido nicotínico mono nucleotídeo (NAMN), pela ação da enzima quinolinato fosforibosiltransferase (QPRT). A seguir o NAMN é transformada a ácido nicotínico adenina dinucleotídeo (NAAD) pela enzima nicotinamida adenina adenilil transferase (NMNAT). A etapa final para a síntese de NAD é um processo de amidação do NAAD pela NAD sintase. A partir do ácido nicotínico (via de Preiss-Handler) a primeira etapa é catalisada pela enzima ácido nicotínico fosfo-ribosil transferase (NAPT), formando o NAMN. Este é convertido a NAAD como já vimos anteriormente pela NMNAT. O NAAD por sua vez requer um processo de amidação para ser transformado a NAD que é realizado pela NAD sintase.

Já a degradação do NAD⁺ ocorre pelas enzimas chamadas sirtuínas. As sirtuínas constituem uma classe de enzimas desacetilases dependentes de NAD⁺, que mostram atividade catalítica num largo espectro de substratos [Bheda, Jing et al., 2016] e regula importantes processos tais como progressão do ciclo celular, ritmicidade circadiana, estabilidade do genoma, transcrição, envelhecimento, biogênese mitocondrial e apoptose [Schiedel, Robaa et al., 2018; Masri 2005; Stromland, Niere et al., 2019]. Sete sirtuínas são descritos em mamíferos (SIRT 1-7) expressos de forma abundante [Dali-Youcef, Lagouge et al., 2007; Michan, Sinclair 2007]. Em mamíferos a localização subcelular das sirtuínas é diferente, assim a SIRT 1, SIRT 6 e SIRT 7 são encontradas principalmente no núcleo, a SIRT 2 é predominantemente citoplasmática, enquanto a SIRT 3, SIRT 4 e SIRT 5 são mitocondriais [Pirinen, LoSasso, Auwerx 2012].

A principal atividade enzimática das sirtuínas é a reação de desacetilação dependente de NAD⁺. Ao lado das histonas, muitos fatores de transcrição e enzimas foram identificados como alvos para desacetilação pelas sirtuínas. Além da desacetilação as sirtuínas mostram outras atividades [Pirinen, LoSasso, Auwerx 2012]. A SIRT 4 tem atividade ADP-ribosil transferase [Haigis, Mostoslavsky et al., 2006]. Já a SIRT 6 apresenta as duas atividades, isto é, a de desacetilação e ADP-ribosil transferase [Liszt, Ford et al., 2005].



Após a desacetilação a sirtuina catalisa a transferência do grupo acetila ($\text{CH}_3\text{-CO-}$) para ADP-ribose do NAD, seguido pela liberação de nicotinamida, 0-acetil-ADP-ribose e substratos desacetilados. Além das atividades desacetilases que requer NAD como substrato [Imai, Armstrong et al., 2000], as sirtuinas catalisam outras reações químicas como des-succinilação, des-propionilação, des-lipoamidação e mono-ADP-ribosilação [Du, Jiang, Lin 2009; Feldman, Dittenhafer-Reed, Denu 2012; Mathias, Grec et al., 2014]. O controle da homeostase de glicose resulta da ação de sirtuinas sobre diferentes tecidos e tem ação crítica durante o jejum. Assim, no fígado em jejum, os níveis de NAD estão aumentados, e este aumento correlaciona-se com o aumento da desacetilação mediado por SIRT 1 e ativação do PGC-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator), o qual promove gliconeogênese pela ativação de um conjunto de fatores de transcrição [Houtkooper, Canto et al., 2010].

Em relação a dieta, a função das sirtuinas de mamíferos é a de induzir a biogênese de mitocôndrias e metabolismo oxidativo durante a restrição calórica [Lagouge, Arghmann et al., 2006; Shi, Wang et al., 2005; Someya, Yu, Hallows 2010], bem como reduzir as espécies reativas de oxigênio e a inflamação [Chalkiadari, Guarante, 2012; Hirschey, Shimazu et al., 2011].

ESTRESSE OXIDATIVO E RESISTÊNCIA A INSULINA

Entendemos por resistência a insulina a condição clínica em que os tecidos periféricos não conseguem responder a estimulação a insulina. Essa condição marcada pela reduzida ação do hormônio para ativar o transporte de glicose, importante para o aproveitamento da glicose pela célula, pode aparecer em condições clínicas como obesidade, síndrome metabólica, gravidez, diabetes tipo 2, obesidade e sepsis [Houstis, Rosen, Lander 2006].

A espécies reativas de oxigênio causam resistência a insulina nos tecidos periféricos afetando vários pontos de transdução de sinal do receptor de insulina, resultando por fim em diminuída expressão do transportador de glicose na membrana celular [Ismail, Scapozza et al., 2014].

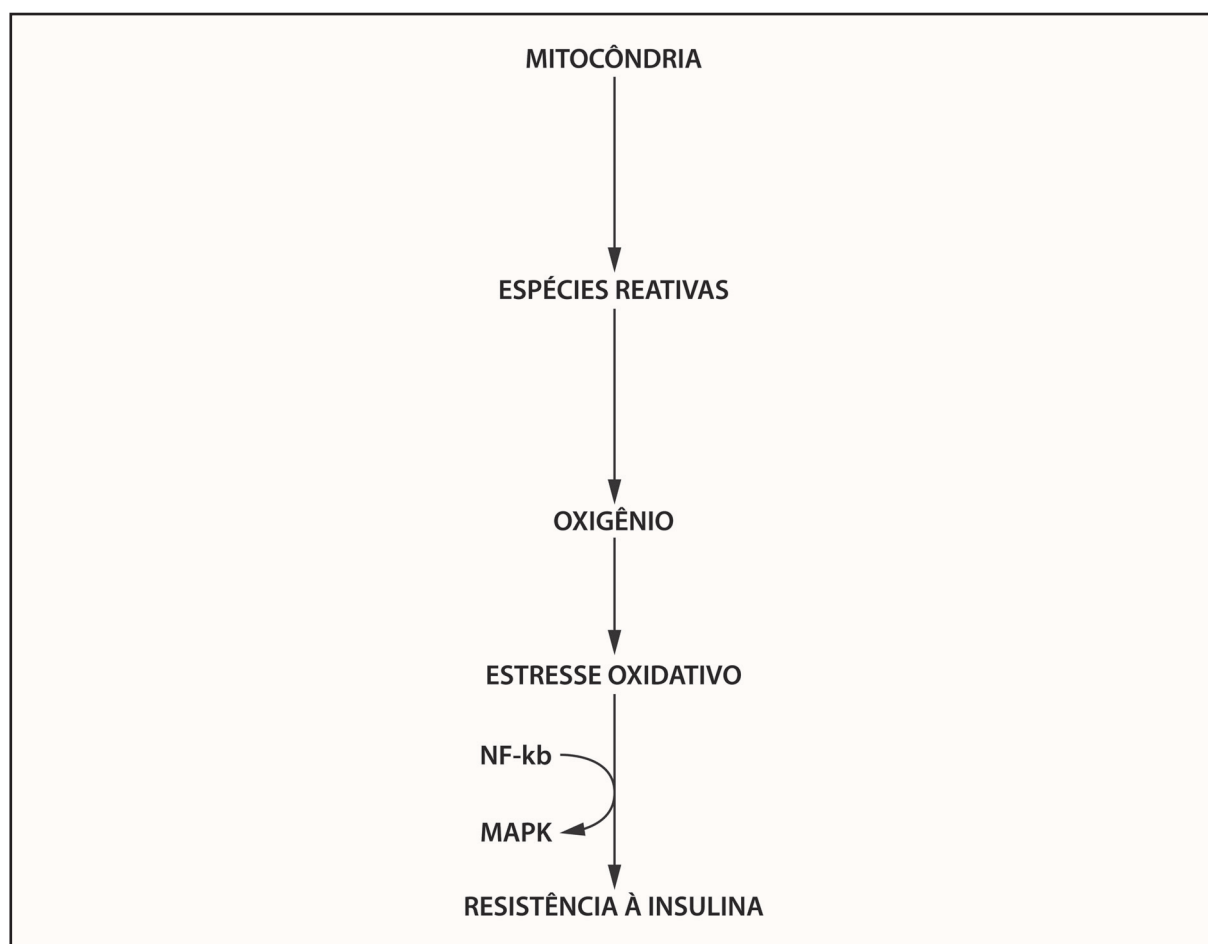
Anteriormente vimos que a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é a principal via de formação de espécies reativas de oxigênio.

Dessa forma, quanto maior a quantidade de nutrientes que a célula tem a sua disposição maior a contribuição mitocondrial para o nível de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo [Ma, Nakagawa et al., 2013; Hurrles, Hsu 2017]. Por outro lado, uma redução no fornecimento de nutrientes para a célula e como consequência a diminuição da disponibilidade de elétrons para a cadeia respiratória proporciona uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio. Após a ativação do receptor pela insulina há o estímulo do fluxo glicolítico [Petersen, Shulman 2002]. Isto, significa que o mecanismo de captação de glicose pela célula pode ser o responsável pela aumentada produção de espécies reativas de oxigênio, após o desafio insulínico, na presença de concentração de glicose suficiente. Portanto, qualquer manifestação de resistência a insulina levaria a uma inibição da ação da insulina, ocorrendo assim, uma redução na captação de glicose. Como consequência, a resistência à insulina causaria uma redução da produção de espécies reativas de oxigênio. Em vista disso, foi sugerido que a resistência à insulina pode ser um processo fisiológico que a célula lança mão para se proteger [Fridlyand, Philipson 2006]. Uma clara ligação entre a disfunção celular induzida por espécies reativas de oxigênio, pode ser observado no estudo, que demonstrou, que a captação de glicose estimulada pela insulina era 60 % menor nos indivíduos que apresentavam resistência a insulina comparados àquele sensíveis à insulina [Petersen, Dufour et al., 2004].

Os efeitos da hiperglicemia e a formação de espécies reativas de oxigênio, na mitocôndria

e consequente ativação do fator de transcrição nuclear kB (NF- kB) precede a estimulação de outros sistemas, indicando isso, que a ativação de NF- kB é o evento inicial da sinalização [Evans, Goldfine et al., 2002] (Figura 5.13). Além de espécies reativas de oxigênio, o NF- kB pode ser, também, ativado por hiperglicemia, ácidos graxos livres, fator de necrose tumoral (TNF- α), citocinas pró-inflamatórias, MAPK [Barnes, Karin 1997]. O fator de transcrição nuclear kB (NF- kB) está presente no citoplasma de células em repouso como um heterodímero inativo, consistindo em duas subunidades (p50 e p65) complexadas a uma subunidade proteica inibidora (IkB). A ativação de NF- kB envolve a fosforilação da subunidade inibidora (IkB), um processo que marca essa subunidade para ubiquitinação e subsequente degradação. A enzima responsável pela fosforilação é a IkB quinase [Karin 1999; Karin, Ben Nariah 2000; Evans, Goldfine et al., 2002].

Figura 5.13 - Esquema da relação mitocôndria, espécies reativas de oxigênio e resistência a insulina



O MAPK constitui uma superfamília de proteínas quinases ativadas pelo mitogênio. Mitogênio é uma proteína (por exemplo um fator de crescimento) que estimula a divisão celular. As cascatas de sinalização de MAPK são reguladas por fosforilação/ desfosforilação dos resíduos serina/treonina e respondem a ativação do receptor de tirosina quinase, receptor de citocinas e fatores de crescimento. Estudos mostraram, que as espécies JNK (c-Jun NH2 terminal kinase) e p38 (da família MAPK) são fortemente ativados por espécies reativas de oxigênio [Abe, Kusuvara et al., 1996; Alen, Tressini 2000; Lo, Wong, Cruz 1996; Guyton, Liu et al., 1996].

O fator de transcrição nuclear (NF- kB) uma vez ativado vai se ligar e ativar o promotor de

vários genes. Vamos lembrar que o promotor é um segmento específico do DNA, adjacente ao gene, em que a enzima RNA polimerase se liga para iniciar o processo de transcrição. Um desses genes é o gene da tioredoxina. A tioredoxina é uma enzima oxido-redutase que atua junto ao sistema glutatona, para estabelecer e manter o estado redox intracelular [Alfadda, Sallam 2012]. Portanto, a associação entre o estresse oxidativo elevado e a resistência a insulina passa pela ativação do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) e membros da família de proteínas quinase ativada pelo mitogênio.

ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES

Este é um assunto que será desenvolvido no capítulo sobre Bioquímica do Diabetes, logo daremos apenas o fato mais importante deste assunto.

De acordo com a hipótese unificada de diabetes proposta por Brownlee e colab, a formação de espécies reativas de oxigênio mediado pela hiperglicemia contribui para as complicações patológicas do diabetes. Essa conclusão, foi originalmente baseada no estudo que demonstrou que a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio podia ser prevenida pela utilização de um desacoplador da cadeia respiratória [Brownlee 2001; Nishikawa, Edelstein et al., 2000].

BIBLIOGRAFIA GERAL

Devlin TM (editor) *Textbook of Biochemistry: clinical correlations*. 7th edition. 2010 John Wiley & Sons. New Jersey, USA

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (editors). *Biochemistry*. 5th edition. 2002. W. H. Freeman and Company, New York, USA

Voet D, Voet JG (editors) *Biochemistry* 2th edition. 1995. John Wiley & Sons, New York, USA.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Abe J, Kusuha M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD 1996. Big mitogen-activated protein kinase-1 (BMK-1) is a redox sensitive kinase. *J Biol Chem* 271: 16586-90.

Adeva-Andany MM, Perez-Felpete N, Fernandez-Fernandez C, Donapetry-Garcia C, Prazos-Garcia C 2016. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep* 36:article e00416 DOI 10.1092/BSR 2016.0385.

Alano CC, Tran A, Tão R et al., 2007. Differences among cell types in NAD compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes and cardiac myocytes. *J Neurosci Res* 85: 3378-85.

Alen RG, Tressini M 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28:463-99.

Alfadda AA, Sallam RM 2012. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* art ID 936486.

Badaway AA 2017. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: regulatory and functional aspects. *Int J Tryptophan Res* 10: 1-10.

Banh S, Treberg JR 2013. The pH sensitivity of H₂O₂ metabolism in skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett* 587:1799-804.

Barnes PJ, Karin M 1997. Nuclear factor – κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-71.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J et al., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci* 87: 1620-4.

Betteridge DJ 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49 (sup 1): 3-8.

Berger F, Lau C, Dahlmann M, Ziegler M 2005. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase isoforms. *J Biol Chem* 280: 36334-41.

Bheda P, Jing H, Wolberger C, Lin H 2016. The substrate specificity of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 85: 405-29.

Brownlee M 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-80.

Canto C, Menzies KJ, Auwerx J 2015. NAD(+) metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab* 22: 31-53.

Chalkiadari A, Guarante L 2012. High-fat diet triggers inflammation induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab* 16: 180-8.

Chance B, Williams GR 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 217: 409-27.

Chance B, Williams GR 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol* 17: 65- 134.

Chini CCS, Tarrago M, Chini E 2017. NAD and aging process: role in life, death and everything in between. *Mol Cell Endocrinol* 455: 62-74.

Choi SE, Fu T, Seok S et al., 2013. Elevated microRNA-34 a in obesity reduces NAD(H) levels and sirt-1 activity by directly targeting NAMPT. *Aging Cell* 12: 1062-72.

Cline GW, Lepine RL, Papas KK, Kibbey RG, Shulman GI 2004. ¹³C NMR isotopomer analysis of anaplerotic pathway in INS-1 cells. *J Biol Chem* 279: 44370-5.

Commoner B, Townsend J, Pake GE 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* 1 74: 689-91.

Connel NJ, Houtkooper RH, Schrauwen P 2019. NAD⁺ metabolism as a target for metabolic health: have we found the silver bullet? *Diabetologia* 62: 888-99.

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological

- approach in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53: 135-59.
- Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S et al., 2007. Sirtuins: the magnificent seven, functions, metabolism and longevity. *Annu Med* 39: 335-45.
- Dean PM, Mathews EK 1970. Glucose induced electrical activity in pancreatic islet cells. *J Physiol* 210:255-64.
- Drechsel DA, Patel M 2010. Respiration-dependent H₂O₂ removal in brain mitochondria via thioredoxin/peroxiredoxin system. *J Biol Chem* 285: 27850-8.
- Droge W 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Du J, Jiang H, Lin H 2009. Investigating the ADP-ribosyl-transferase activity of sirtuins with NAD analogues and 32P-NAD. *Biochemistry* 48: 2878-90.
- Evans JL, Godfine ID, Maddux BA, Grodsky GM 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrinol Rev* 23: 599-622.
- Fang EF, Lautrup S, Hou Y et al., 2017. NAD(+) in aging: molecular mechanism and translational implications. *Trends Mol Med* 23: 899-916.
- Feldman JL, Dittenhafer-Reed KE, Denu JM 2012. Sirtuins catalysis and regulation. *J Biol Chem* 287: 42419-27.
- Frederiks WM, Vizan P, Bosch KS, et al., 2008. Elevated activity of the oxidative and non-oxidative pentose phosphate pathway in (pre) neoplastic lesions in rat liver. *Int J Exp Pathol* 89: 232-40.
- Fridovitch I 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- Fridlyand LE, Philipson LH 2006. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Obesity Metab* 8: 136-42.
- Gatenby RA, Gillies RJ 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891-9.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation a mechanism in common. *Science* 119: 62362-6.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271: 4238-42.
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM et al., 2006. Sirt 4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126: 941-54.
- Halliwell B, Gutteridge JMC 1989. Free radicals in biology and medicine. *Clarendon Press, Oxford*

Halliwell B 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Free Radic Antioxid* 344: 721-4.

Harman D 2009. Origem and evolution of the radical theory of aging: a brief personal history 1954-2009. *Biogerontol* 10: 773-81.

Hirchey MD, Shimazu T, Jing E et al., 2011. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of metabolic syndrome. *Mol Cell* 44: 177-90.

Hurrles S Hsu WH, 2017. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J* 40: 257- 62.

Houstis N, Rosen ED, Lander 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440: 944-8.

Houtkooper RH, Canto C, Wanders RJ, Auwerx J 2010. The secret life of NAD: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrinol Rev* 31: 194-223.

Ismail H, Scapozza L, Rueg V, Dorchies O 2014. Diapocynin a dimmer of NADH oxidase inhibitor apocynin reduces ROS production and prevents force loss in eccentrically contracting dystrophic muscle. *PLoS Med* 9: 1-8.

Jenkins CM, Yang J, Sims HF, Gross RW 2011. Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by acyl-CoA. A mechanism integrating glycolytic flux with with lipid metabolism. *J Biol Chem* 286: 11937-50.

Jin L, Zhou Y. 2019. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumor. *Oncology Lett* 17: 4213-21.

Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ et al.,2006. Regulatory role for the arginine -nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 17: 571-88.

Karin M 1999. How NF-kB is activated: the role of Ikb kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18: 6867-74.

Karin M, Ben Neria Y 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kB activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621-63.

Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “house keeping” enzyme subject to tissue specific regulation by hormones, nutrients and oxidant stress. *FASEB J* 8: 174-81.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z et al., 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 alpha. *Cell* 127: 1109-22.

Leopold R, Walker J Scribner AW et al., 2003. Guucose-6-phosphate dehydrogenase modulates vascular endothelial growth factor mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 278: 32100-6.

Li C, Najafi H, Daikhin Y et al., 2003. Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J Biol Chem* 278: 2853-8.

- Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L 2005. Mouse sir2 homolog SIRT 6 is a nuclear ADP-Ribosyl Transferase. *J Biol Chem* 280: 21313-20.
- Lo YYC, Wong JMS, Cruz TF 1996. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-jun NH2 terminal kinases. *J Biol Chem* 271: 15703-7.
- Loschen G, Azzi A, Flohe L 1973. Mitochondrial H₂O₂ formation: relationship with energy conservation. *FEBS Lett* 33: 84-7.
- Lunt SY, Vander heiden MG 2011. Aerobic glycolysis meeting the metabolic requirements for cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 441-64.
- Lushchak VI 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101: 13-30.
- Lushchak VI 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biol Interact* 224: 164-75.
- Ma J, Nakagawa Y, Kojima I, Shibata H 2013. Prolonged insulin stimulation down regulates GLUT 4 through oxidative stress mediated retromer inhibition by a protein kinase CK 2 dependent mechanism in 3T3-L-1 adipocytes. *J Biol Chem* 298: 133-42.
- MacDonald MJ 1995. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem* 270: 20051-8.
- Magder S 2006. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care* 10 (1): 208 doi. 10.1186/cc 3992.
- Magni G, Amici A, Emanuelli M et al., 2004. Enzymology of NAD(+) homeostasis in man. *Cell Mol Life Sci* 61: 19-34;
- Mathias RA, Grec TM, Oberstein A et al., 2014. Sirtuin4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell* 159: 1615-25.
- Matschinsky FM, Wilson DF 2019. The central role of glucokinase in glucose homeostasis: A perspective 50 years after demonstrating the presence of the enzyme in islets of Langerhans. *Frontiers Physiol* 10: article 148/DOI 10.3389/fphys 2019. 00148.
- Masri S 2005. Sirtuins dependent clock control: new advances in metabolism, aging and cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18: 521-7.
- Meininger JS, Marinos RS, Hatayama K et al., 2000. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rats due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J* 349: 353-6.
- Meissner HP, Schmelz H 1974. Membrane potential of beta cells in pancreatic islets. *Pflugers Arch* 351: 195-206.
- Michan S, Sinclair D 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological functions. *Biochem J* 404: 1-13.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA 1991. Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Pharmacol Ver* 43: 109-42.

Najafi H, Daikhim Y et al., *JBC* 278:2853-8

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL et al., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-90.

Nohl H, Gille L, Schonheit K, Liu Y 1996. Conditions allowing redox cycling ubiquinone in mitochondria to establish a direct redox couple with molecular oxygen. *Free Rad Biol Med* 20: 207-13.

Opara E 2006. Oxidative stress. *Dis Mon* 52: 183-98.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-24

Petersen KF, Shulman GI 2002. Pathogenesis of skeletal muscle of insulin resistant in type 2 diabetes. *Am J Cardiol* 90: 11G-18G.

Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI 2004. Impaired mitochondrial activity in the insulin resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350: 664-71.

Pirinen E, LoSasso G, Auwerx J 2012. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. *Best Pract Res XClin Endocrinol Metab* 26: 759-70.

Pryor WA 1986. Oxy radicals and related species: their formation, life times and reactions. *Annu Rev Physiol* 48: 657-67.

Radi R 2018 Oxygen radicals, nitric oxide and peroxynitrite. Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci* 115: 5839-48.

Raha S, Robinson BH 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 25: 502-8.

Schiedel M, Robaa D, Rumpf T, Sippl W, Jung M 2018. The current state of NAD⁺ dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets. *Med Res Rev* 38: 147-200.

Schroder K, Weissmann RP 2017. Brandes, organizers and activator: cytosolic NOX protein impacting on vascular function. *Free Radic Biol Med* 109: 22-32.

Schroder K 2020. NADPH oxidases: current aspects and tools. *Redox Biol* 34: 101512, doi org 10.1016/j.redox.2020.101512.

Schuit F, De Vos A, Farfari S et al., 1997. Metabolic fate of glucose in purified islet cells: glucose regulated apoptosis in β -cells. *J Biol Chem* 272:18572-9.

Sheeran FI, Angerosa J, Liaw NY, Cheung MM, Pepe S 2019. Adaptations in protein expression and regulated activity of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex in human systolic heart failure. *Oxid Med Cellular Longevity* 2019, article ID 4532592.

- Shi T, Wang F, Stierene E Tong Q 2005. SIRT3 a mitochondrial deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280: 13560-7.
- Sies H, Berndt C, Jones DP 2017. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 86: 715-48.
- Sirover MA 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432: 159-84.
- Skulachev VP 2012. Mitochondria targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age related brain diseases. *J Alzheimer Dis* 28: 283-9.
- Someya S, Yu W, Hallows WC 2010. SIRT3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143: 802-12.
- Snirivasan M, Choi CS, Ghoshal P, et al., 2010. Beta cell specific pyruvate dehydrogenase deficiency impairs glucose stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: 910-7.
- Srivastava S 2016. Emerging therapeutic roles for NAD metabolism in mitochondrial and the age related disorders. *Clin Transl Med* 5: 25 DOI 10.1186/s 40169-016-0104-07.
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093-29.
- Stromland O, Niere M, Nikiforov AA, et al., 2019. Keeping the the balance in NAD metabolism. *Biochem Soc Trans* 47: 119-30.
- Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ et al., 2004. Update on mechanism and catalytic regulation in NO synthases. *J Biol Chem* 279: 36167-70.
- Sugden MC, Bulmer K, Augustine D, Holness 2001. Selective modification of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms expression in rat pancreatic islets elicited by starvation and activation of peroxisome proliferator activated receptor-0alpha: implications for glucose stimulated insulin secretion. *Diabetes* 50: 2729-36.
- Sutendra G, Kinnaird A, Dromparis P et al., 2014. A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation. *Cell* 158: 84-97.
- Takac I, Schroder K, Zhang I et al., 2011. Brandes, the E-loop in involved in hydrogen peroxide formation by NADPH oxidase NOX-4. *J Biol Chem* 286: 13304-13.
- Thoden JB, Wohlers TM, Fridovich-Keil JL, Holden HM 2000. Crystallographic evidence for Tyr 157 functioning as the active site base in human UDP-galactose-4-epimerase. *Biochemistry* 39: 5691- 701.
- Tian WN, Braunstein LD, Apse K et al., 1999. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol* 276: XC 1121-31.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al., 2007. Free radicals and antioxidant in normal physiological function and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-85.

Vermot A, Petit-Hartlein I, Smith SME, Fieschi F 2021. NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery molecular mechanisms to physiology and pathology. *Antioxid* 10, 890 doi.org/10.3390/antioxid10060890.

Vershueren KHG, Blanchet C, Felix J et al., 2019. Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature* 568: 571-5

Xu J, Han J, Epstein PN, Liu YQ 2006. Regulation of PDK mRNA by high fatty acid and glucose in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 827-33.

Zoccarato F, Cavallini L, Alexandre A 2004. Respiration dependent removal of exogenous H₂O₂ in brain mitochondria: inhibition by Ca₂⁺. *J Biol Chem* 279: 4166-74.

Yki-Jarvinen H, Vogt C, Iozzo P et al., 1997. UDP-N-acetylglucosaminetransferase and glutamine: fructose-6-phosphate amido transferase activities in insulin sensitive tissues. *Diabetologia* 40: 76-81.

Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S 2011. Nicotinamide mononucleotide a key NAD intermediate treats the pathophysiology and ameliorates age-associated insulin resistance. *Aging Cell* 2018: e12798 doi.org/10.1111/ace12798.

CAPÍTULO 6- ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE DIABETES

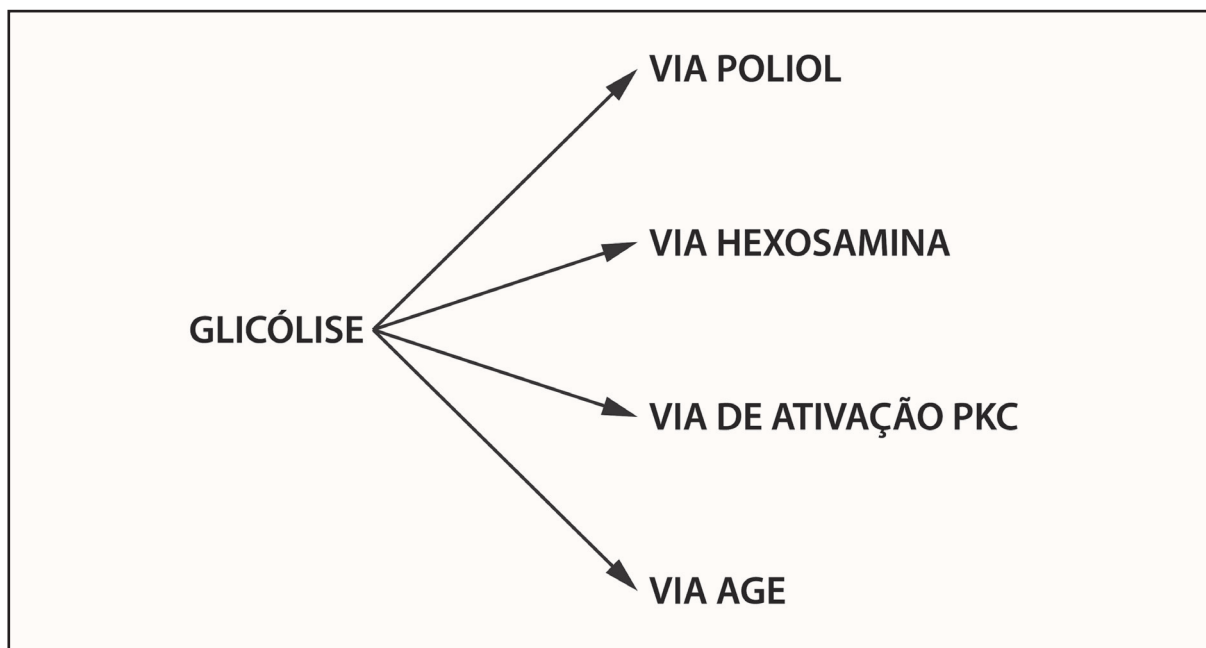
Antes de discorrermos sobre a bioquímica de diabetes, é importante conceituarmos o termo Bioquímica. Numa definição mais simples podemos dizer, que o termo bioquímica, refere-se a uma tentativa de estudar as bases moleculares da vida.

Em seu livro “O Segredo da Vida”, James Watson (prêmio Nobel de física, pelo seu trabalho sobre o DNA) escreveu sobre a dupla hélice do DNA (ácido desoxirribonucleico); “a dupla hélice é uma estrutura sucinta, mas sua mensagem não poderia ser mais prosaica, a vida é uma simples questão de química”. A vida é uma simples questão de química e nesse contexto, a Bioquímica tem por objetivo estudar e descrever os fenômenos que ocorrem no ser vivo na linguagem da química, utilizando-se para isso do conhecimento de outras áreas. Grande parte dos estudos bioquímicos estão concentrados a nível molecular, estruturas de membranas, partículas subcelulares, bem como no genoma. A fim de explicar a vida em termos químicos e físico-químicos cada nível de organização deve ser estudado.

As reações químicas que ocorrem nos organismos vivos são altamente controladas, mantendo um ambiente interno relativamente constante (homeostase). Qualquer alteração no equilíbrio do sistema bioquímico, leva a uma condição alterada (doença). Já vimos que a glicose é extraída dos alimentos no trato gastrointestinal. Após sua absorção no intestino, a glicose é liberada para a corrente sanguínea. O nível dito normal da glicose no sangue gira ao redor de 5,5 mM (cerca de 100 mg/dL) é altamente regulada, sendo o resultado de sua captação pelos tecidos e sua taxa de síntese pelo fígado [Klover, Mooney 2004] e em menor escala pelos rins [Gerich, Woerle et al., 2001]. O aumento do nível de glicose no sangue, vai estimular as células beta pancreáticas a secretarem o hormônio insulina, o qual, por sua vez, vai estimular a captação de glicose pelos tecidos sensíveis (músculo e tecido adiposo). Dentro das células a glicose pode seguir vários caminhos, como ser armazenada sob a forma de glicogênio, ou seguir a via glicolítica, ciclo de Krebs e cadeia respiratória, ou ser transformada em gordura no tecido adiposo. Cerca de 75% de toda glicose da corrente sanguínea é consumida por tecidos insensíveis a insulina, como cérebro, eritrócito, fígado e intestino, enquanto o restante, o é pelos tecidos sensíveis a insulina como músculo e tecido adiposo. [Gerich 1993].

Pós-prandial (após o indivíduo se alimentar) há um rápido aumento da concentração de glicose no sangue, que estimula a secreção de insulina, resultando num aumento temporário de insulina no sangue, uma condição conhecida como hiperinsulinemia. A manutenção da concentração da glicose no sangue em valores ditos normais é conhecida como euglicemia. A falta de insulina ou uma ação deficiente do hormônio altera o equilíbrio dinâmico (homeostase), levando ao não aproveitamento adequado da glicose, causando um estado hiperglicêmico (diabetes). Portanto, diabetes melito é uma doença multi-sistema complexa, caracterizada por uma insuficiência, relativa ou absoluta da secreção de insulina ou então uma concomitante resistência a ação metabólica da insulina [*Expert Committee on the Classification of Diabetes 2003*]. A hiperglicemia crônica causa complicações como retinopatia, catarata, aterosclerose, neuropatia, nefropatia e distúrbio do processo de cicatrização. Por que as células destes tecidos são vulneráveis a hiperglicemia e outras não? A resposta está no fato de que muitas células são capazes de reduzir o transporte de glicose no seu interior quando expostos a hiperglicemia. Ao contrário as células lesadas não são eficientes nesse aspecto [Kaiser, Sasson et al., 1993; Heilig, Concepcion et al., 1995; Brownlee 2005]. Sob o ponto de vista metabólico, a hiperglicemia estimula algumas vias, as quais no estado euglicêmico, operam numa taxa muito pequena, sendo negligível [Brownlee M. 2005], tais como via poliol, via hexosamina, ativação de proteína quinase C (PKC) e via de produtos finais de glicação avançada (AGE). Todas essas vias metabólicas se originam de intermediários da via glicolítica (Figura 6.1).

Figura 6.1 - Intermediários da via glicolítica podem ser utilizados para outras vias

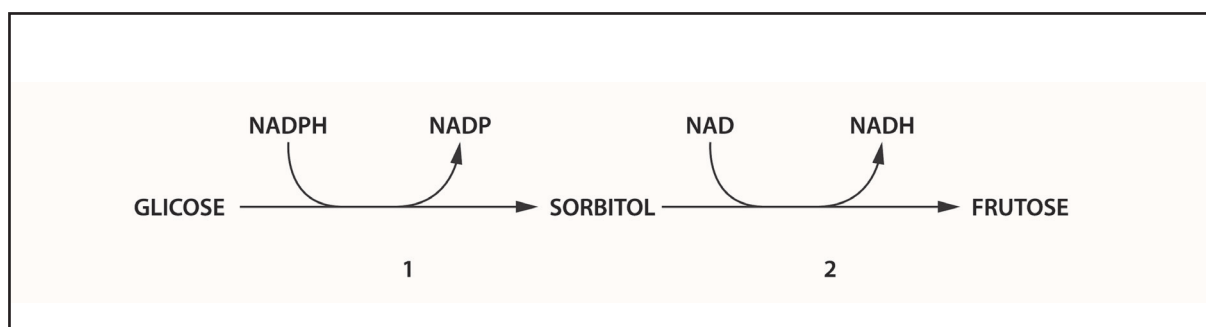


Na via do polioliol, a glicose é transformada ao polialcool sorbitol, numa reação catalisada pela enzima aldose redutase. Posteriormente, o sorbitol é convertido a frutose pela enzima sorbitol desidrogenase. Na via das hexosaminas, a frutose-6-fosfato é transformada a glicosamina-6-fosfato, que por sua vez dá origem a uridina difosfato N-acetil glicosamina. Já a via de ativação da proteína quinase C, se origina da dihidroxiacetona fosfato, passando pelo glicerol-3-fosfato e diacilglicerol (DAG), enquanto a via de formação de produtos finais de glicação avançada (AGE) tem início a partir do gliceraldeído-3-fosfato, passando por metilglioxal.

VIA DO POLIOL

A via do polioliol consiste em duas reações enzimáticas, sendo a primeira catalisada pela aldose redutase e a segunda reação catalisada pela sorbitol desidrogenase. A primeira enzima da via do polioliol, a aldose redutase é uma oxidorreductase localizada no citossol, que catalisa a transformação de glicose a sorbitol utilizando como cofator o NADPH. A segunda reação é catalisada pela sorbitol desidrogenase e transforma o sorbitol a frutose (Figura 6.2). A aldose redutase é uma enzima que apresenta uma constante de Michaelis-Menten (K_m) alta. Neste ponto, vejamos o que significa o K_m de uma enzima.

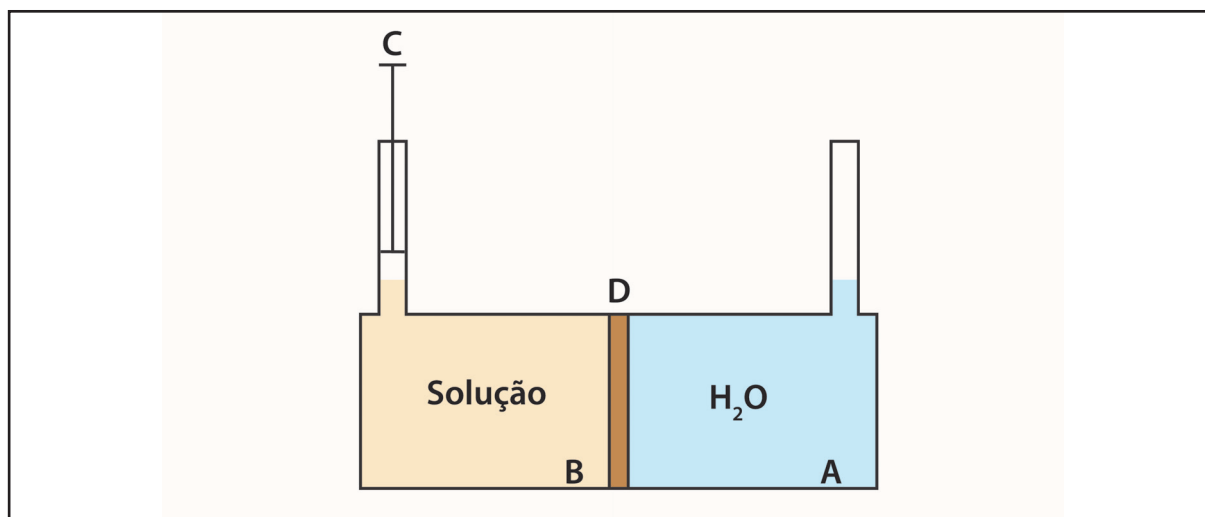
Figura 6.2 - Reações químicas da via polioliol. 1 aldose redutase; 2- sorbitol desidrogenase



O valor de K_m serve para indicar a interação enzima-substrato. Um K_m baixo significa que a concentração do substrato é pequena, para que a enzima possa catalisar a reação, isto é, a afinidade da enzima para com o substrato é alta, enquanto um K_m alto significa, que a concentração do substrato, para que a enzima possa atuar é alta, significando uma baixa afinidade da enzima pelo substrato. Para firmarmos bem o que significa K_m vamos usar como exemplo, o que acontece no fígado, com as enzimas que atuam sobre a glicose, isto é, a hexoquinase (K_m baixo) e a glicoquinase (K_m alto). Quando a concentração de glicose no sangue for normal (euglicemia), a concentração da glicose intracelular também é baixa e a fosforilação de glicose para glicose-6-fosfato é catalisada pela hexoquinase, que apresenta um K_m baixo, o que significa alta afinidade ao substrato. Contudo, pós-prandial a concentração de glicose aumenta e atingindo o valor do K_m da glicoquinase, que é alto, esta enzima também catalisa a fosforilação de glicose. Logo podemos dizer que a afinidade da glicoquinase é baixa, porque é necessário uma alta concentração do substrato para a enzima atuar. Sob condições glicêmicas normais, somente uma pequena fração da glicose é metabolizada através da via do poliol, uma vez que a maior parte da glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato, que segue a via glicolítica e a via pentose fosfato. Durante a hiperglicemia o fluxo da via poliol varia. Assim, cerca de 33 % do total de glicose no cristalino (ou lente) do coelho é utilizado, enquanto nos eritrócitos humanos somente 11 %. Dessa forma, a contribuição da via do poliol para as complicações de diabetes pode ser dependente de espécie, local e tecido [Brownlee 2001]. Dessa forma, podemos dizer que a via do poliol se torna ativa, quando a concentração de glicose intracelular for elevada. Como explicar o aumento da via do poliol com as complicações de diabetes? Foram propostos alguns mecanismos, entre os quais citamos: (1) estresse osmótico induzido pelo sorbitol; (2) redução da atividade da ($\text{Na}^+ \text{K}^+$) ATPase; (3) aumento da relação NADH/NAD citossólico e (4) redução de NADPH citossólico.

No primeiro mecanismo proposto, o sorbitol formado pela redução da glicose, numa reação catalisada pela enzima aldose redutase, é um polialcool hidroxilado, apresentando 6 hidroxilas, portanto altamente hidrofílico, que não se difunde através da membrana celular, acumulando-se dentro da célula, com consequências osmóticas [Gabbay 1973]. O que entendemos por consequências osmóticas? Para que possamos entender o seu significado vejamos o que vem a ser osmose e pressão osmótica. Quando uma solução aquosa de um soluto é separada da água pura por uma membrana semipermeável, isto é, uma membrana que permite a passagem de água, mas não a do soluto dissolvido, a água sempre tende a passar através da membrana em direção a solução, diluindo-a. O fenômeno é conhecido como osmose. O aparelho mostrado na figura 6.3 é composto por uma câmara dividida por uma membrana semipermeável (D) em dois compartimentos, um (A) contendo água pura e outro (B) contendo uma solução.

Figura 6.3 - Pressão osmótica de soluções



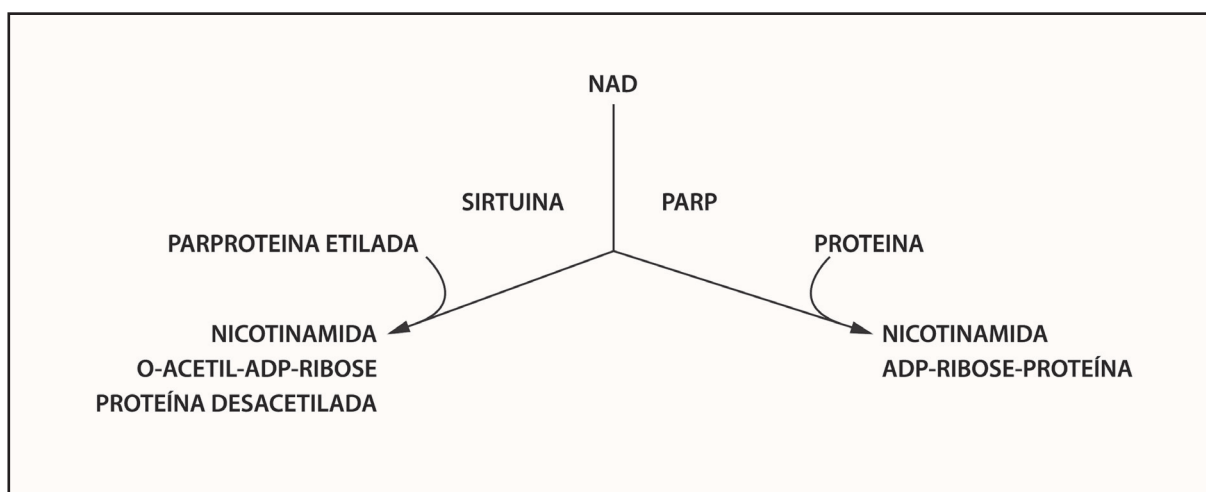
Ambos, compartimentos, apresentam uma abertura nas extremidades. Na abertura do compartimento contendo a solução tem um pistão (C). Como a membrana semipermeável impede a passagem do soluto, a tendência é a água migrar por osmose para a solução mais concentrada. Essa difusão pode ser contrabalanceada impondo uma pressão no pistão (C) da solução mais concentrada, a fim de manter o equilíbrio. Essa pressão é referida como pressão osmótica. Portanto, a pressão osmótica é a pressão gerada pelo fluxo de solvente através de uma membrana semipermeável de uma solução mais concentrada de um lado, para uma solução menos concentrada do outro. Em certos tecidos como a retina por exemplo, o conteúdo da enzima sorbitol desidrogenase é baixo [Aldebasi, El-Gendy et al., 2013]. Como a sorbitol desidrogenase converte o sorbitol a frutose, se o seu conteúdo for baixo, ou se a relação entre a atividade da aldose redutase e a sorbitol desidrogenase pender para o lado da aldose redutase, teremos um acúmulo de sorbitol. Já vimos que o sorbitol é um polialcool hidroxilado e que não atravessa a membrana celular. Este acúmulo do sorbitol intracelular altera a pressão osmótica da membrana celular levando a um estresse osmótico [Kador, Kinoshita 1985], que parece ser o mecanismo básico da retinopatia [Kinoshita 1965; Robison, Kador, Kinoshita 1983]. Contudo, mesmo no mesmo órgão, populações diferentes de células podem ter níveis diferentes de sorbitol desidrogenase, e dessa forma o efeito do sorbitol nos tecidos diabéticos é distinto [Yan 2018].

Outro mecanismo proposto, para explicar o aumento do fluxo da via do poliol é a redução da atividade da adenosina trifosfatase dependente de sódio e potássio [$\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase], um transportador de membrana. A membrana celular possui proteínas intrínsecas chamadas canais ou poros, responsáveis pelo transporte de moléculas específicas através da membrana. Todas as células de mamíferos, contém o transportador $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase do tipo P (transportador do tipo P é a proteína que durante sua atividade de transporte é fosforilada e desfosforilada). O sistema ATPase trocadora de Na^+ e K^+ é uma proteína integral de membrana constituída por duas subunidades β e duas subunidades α . Durante o transporte a subunidade α é fosforilada, uma reação que requer Na^+ , mas não K^+ , enquanto a desfosforilação requer a ligação de K^+ mas não a de Na^+ . A $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase mantém a concentração intracelular de Na^+ baixa e a de K^+ alta, em relação ao interstício na troca de 3Na^+ por 2K^+ , pela enzima ATPase. Muito embora durante algum tempo, esse mecanismo proposto chamou a atenção dos pesquisadores, foi demonstrado que a redução da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, se deve mais a ativação da proteína quinase C (PKC) induzida pela hiperglicemia, que por sua vez atua sobre a fosfolipase A2, aumentando, por conseguinte a produção de dois inibidores da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, isto é, o araquidonato e a prostaglandina E2 (PGE2) [Xia, Kramer, King 1995]. O araquidonato é o sal do ácido araquidônico. A fosfolipase A2 é uma enzima que atua nos fosfoglicerois, importantes componentes de membranas biológicas, que tem ácidos graxos como parte de sua estrutura. Vários fosfolipídeos são substratos da fosfolipase A2, cuja atuação produz ácidos graxos livres, tais como o ácido araquidônico. O ácido araquidônico é o precursor de prostaglandinas, pelo sistema ciclo-oxigenase. As prostaglandinas são mediadores naturais da inflamação e receberam esse nome, por terem sido detectados, primeiramente, no líquido seminal da próstata. Outro mecanismo proposto para explicar o fluxo da via do poliol é o aumento da relação NADH/NAD⁺ citossólico (estresse redutivo). O sorbitol formado pela redução da glicose, uma reação catalisada pela enzima aldose redutase, é convertido a frutose, pela enzima sorbitol desidrogenase, utilizando como cofator o NAD⁺ (processo de oxirredução), aumentando a concentração da forma reduzida (NADH) e consequentemente aumentando a relação NADH/NAD⁺. Sendo o NAD⁺ um cofator da reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (que transforma o gliceraldeído-3-fosfato para gliceraldeído -1,3- difosfato), sua diminuição causa redução da atividade da enzima e como consequência, há o acúmulo de trioses-fosfatos, dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato [Williamson, Chang et al. 1993].

O aumento da relação NADH/NAD⁺ é conhecido como pseudohipóxia e está ligado a

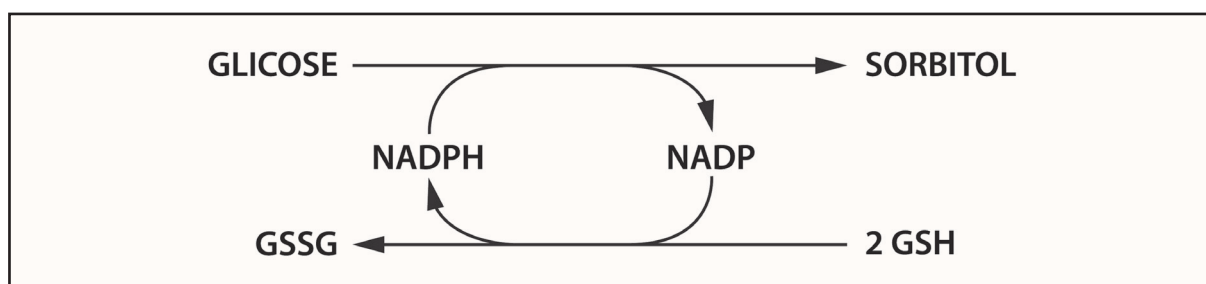
alterações metabólicas e de sinalização que influenciam a função celular [Williamson, Chang et al., 1993]. Por outro lado, o NAD^+ serve de substrato para enzimas como a poli-ADP-ribose polimerase ou PARP [Chambom, Weill, Mandel 1963] e desacetilases dependentes de NAD^+ ou sirtuínas [Imai, Armstrong et al 2000], processos consumidores de NAD^+ (Figura 6.4). A poli-ADP-ribose-polimerase (PARP) é uma enzima que atua sobre o NAD^+ , transferindo o ADP-ribose do NAD^+ para si, histonas ou outras proteínas em locais de danos do DNA para facilitar seu reparo e manutenção da integridade do genoma [Imai, Guarente 2014]. O dano de DNA recruta a PARP e ativa sua atividade poli-ADP-ribosilação. Sirtuínas, como já vimos em outro capítulo são enzimas desacetilases (dependentes de NAD^+). A ativação de PARP causa um esvaziamento de NAD^+ reduzindo a taxa de glicólise e a função mitocondrial, levando eventualmente a morte celular.

Figura 6.4 - Atuação das enzimas poli-ADP-ribose polimerase (PARP) e sirtuínas. PARP = poli-ADP-ribose polimerase



PARP também, inibe a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que sua vez aumenta o influxo, através da ativação de proteína quinase C (PKC) induzido pela hiperglicemia, da via das hexosaminas e formação de AGE, que inicia a produção de ROS e espécies de nitrogênio, desempenhando um papel na patogênese da disfunção neuro e endotelial na retina diabética [Zheng, Kern 2009]. Outro mecanismo proposto para explicar o fluxo do polioli é a redução da concentração de NADPH. O NADPH é um cofator nas reações enzimáticas catalisadas pela aldose redutase e glutatona redutase. A glutatona redutase é uma flavoproteína, que usa o NADPH para converter a glutatona dissulfeto (GSSG) para glutatona reduzido (GSH). Portanto, podemos considerar que existe um processo competitivo entre as duas enzimas pelo cofator NADPH (Figura 6.5).

Figura 6.5 - NADPH como cofator para as reações da aldose redutase e glutatona redutase



A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo, formado por três amino ácidos, o ácido glutâmico, a cisteína e a glicina (γ -glutamil-cisteinil-glicina). A cisteína apresenta um grupo sulfidril livre, importante para manter o estado reduzido da célula. O grupo carboxílico do ácido glutâmico, que forma a ligação peptídica com a cisteína, não é o convencional de amino ácidos, mas sim o grupo carboxílico da extremidade oposta.

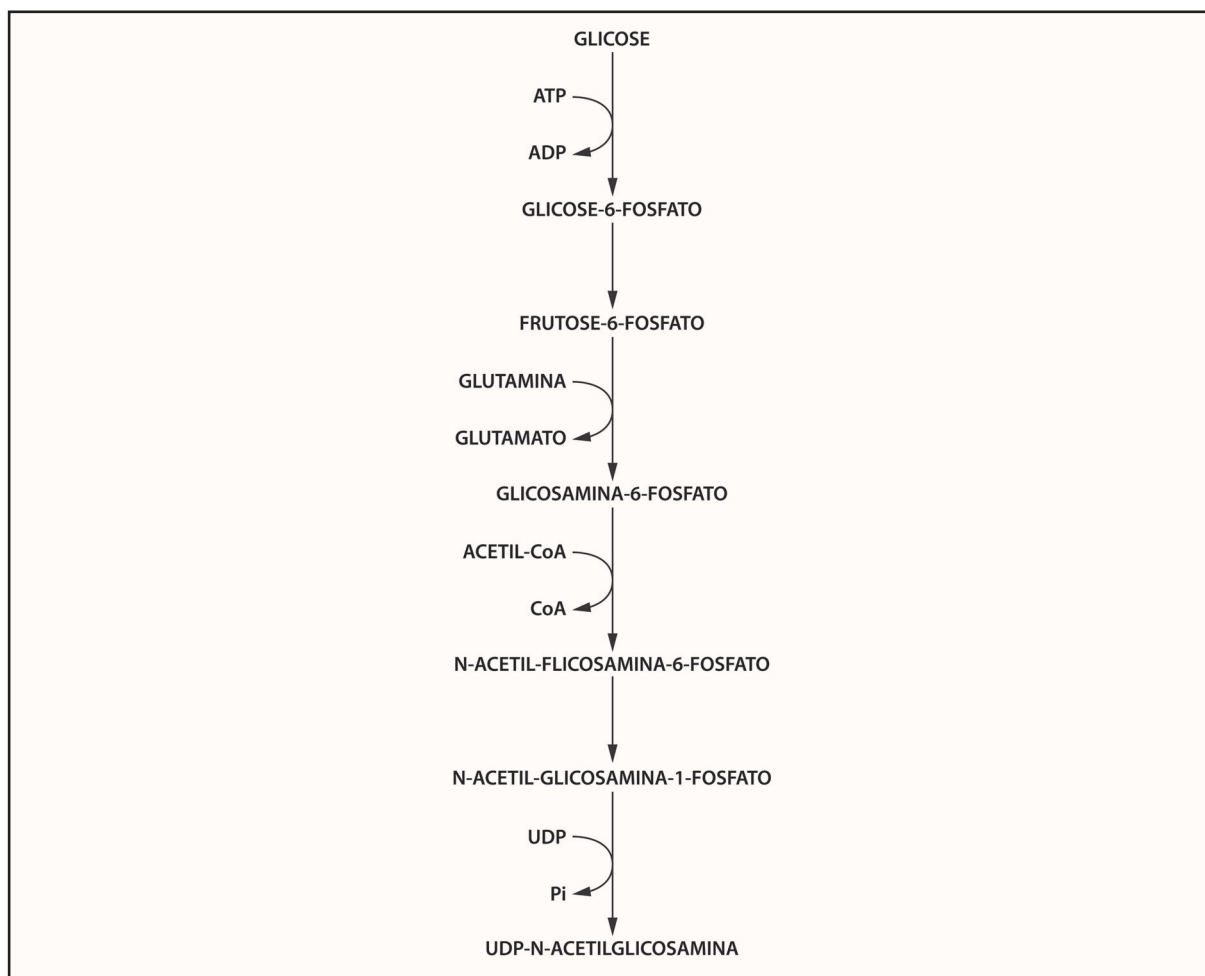
O fato do resíduo de cisteína possuir um grupo sulfidril (-SH) livre, ele pode se oxidar não enzimaticamente a glutathiona dissulfeto (GSSG). Cerca de 80-85% do GSH está presente no citossol, 10-15% na mitocôndria e o restante no retículo endoplasmático e núcleo [Lu 2000]. A relação GSH/GSSG serve como um marcador representativo da capacidade antioxidante da célula [Griffith 1999]. Várias condições clínicas estão associadas a redução de GSH, bem como a relação GSH/GSSG e como consequência, pode resultar uma menor capacidade antioxidante da célula [Exner, Wessner et al., 2000]. Há evidências de que a concentração de NADPH está reduzida no diabetes [Chandra, Jackson et al., 2002; Lee, Chung 1999; Obrosova 2005], fato que pode diminuir o conteúdo de GSH [Harding, Blakytyn, Ganea 1999; Yan, Christians et al., 2002]. A diminuição da forma reduzida da glutathiona (GSH) causa um aumento da susceptibilidade de estresse oxidativo intracelular via do poliol [Brownlee 2005]. Além de ser um importante agente antioxidante, o GSH é também, determinante da sua ligação redox, regula a proliferação celular, a apoptose, a função imune e a fibrinogênese [Lu 2013]. No eritrócito o NADPH desempenha um importante papel. Ele atua como cofator para a enzima glutathiona redutase, responsável pela redução da glutathiona dissulfeto (GSSG) a glutathiona reduzida (GSH), o qual pelo grupo sulfidril livre (-SH) mantém resíduos de cisteína da hemoglobina e outras proteínas numa forma funcionante. Logo podemos inferir que a glutathiona reduzida serve como um tampão de grupos sulfidrilas.

VIA HEXOSAMINAS

Várias manifestações de complicações de diabetes podem ser causadas pela via das hexosaminas [Kolm-Litti, Sauer et al., 1998]. Embora já tenhamos abordado essa via em outro capítulo, acreditamos nunca ser de mais voltarmos a ela. Uma vez dentro da célula a glicose sofre um processo de fosforilação, uma reação catalisada pela enzima hexoquinase (HK), formando a glicose-6-fosfato (G-6-P). Essa fosforilação impede que a glicose possa deixar a célula, já que a G-6-P não atravessa a membrana celular. A G-6-P pela ação de uma isomerase é transformada a frutose-6-fosfato (Fru-6-P). Vamos lembrar, que isomerases constituem uma classe de enzimas envolvidas com a movimentação de um grupo ou uma dupla ligação dentro da mesma molécula. Isso inclui, mudança de posição de uma hidroxila e carbonila, como o que acontece na reação que converte G-6-P a Fru-6-P. A Fru-6-P é então transformada a glicosamina-6-fosfato (glcn-6-P), numa reação catalisada pela enzima glicosamina-6-fosfato sintetase ou glutamina: frutose-6-fosfato amido transferase (GFAT). O desvio da Fru-6-P da via glicolítica para a via das hexosaminas serve para fornecer substratos para reações que requerem uridina difosfato N- acetil glicosamina (UDP-GlcNAc), tais como a síntese de proteoglicanas e glicosilação de proteínas [Yki-Jarvinen, Vogt et al., 1997]. A Glcn-6-P, por sua vez, sofre um processo de acetilação, isto é, introdução de um grupo acetila na molécula, reação em que a coenzima A é a doadora do grupo acetila. Esta reação catalisada pela enzima Glcn-6-P acetil transferase forma a N-acetil glicosamina-6-fosfato (GlcN-6-P NAc). Como o próprio nome diz, as transferases formam uma classe de enzimas responsáveis pela transferência de um grupo químico de uma molécula para outra. No nosso caso, ela transfere o grupo acetila da acetil-CoA para a Glcn-6-P). Uma outra transferase, a N-acetil glicosamina-1-fosfato uridil-transferase, catalisa a transferência do grupo uridina difosfato, do UTP (uridina trifosfato) formando a uridina difosfato-N-acetil glicosamina (UDP-GlcNAc). Na célula, a maior parte da glicose é metabolizada através da via glicolítica,

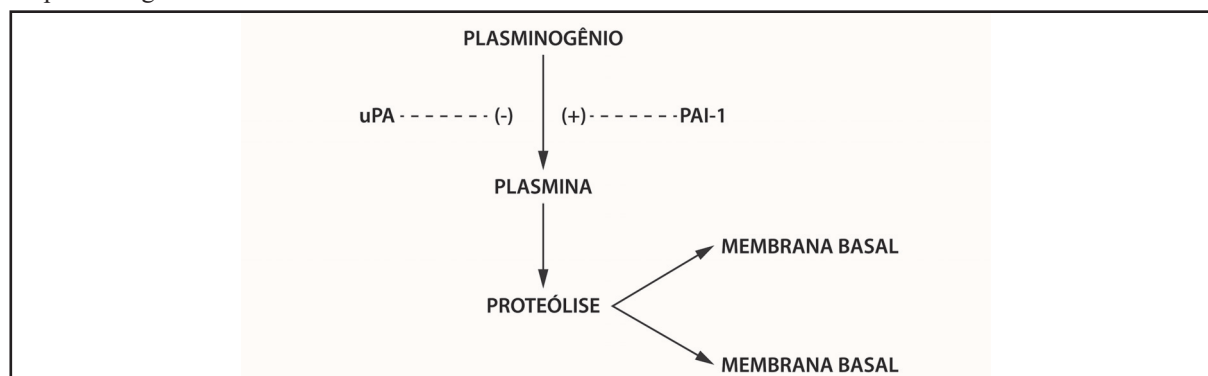
contudo, em algumas circunstâncias a Fru-6-P é desviada da glicólise para a via das hexosaminas, pela enzima glutamina:frutose-6-fosfato amido transferase (GFAT), e dessa forma, essa via forma a UDP-N Acetil glicosamina (UDP-GlcNAc), um composto muito importante, porque: (1) quantitativamente é o principal produto final da via das hexosaminas; (2) é um inibidor alostérico da enzima glutamina:frutose-6-fosfato amido transferase (GFAT), a primeira enzima da via das hexosaminas e (3) é um substrato obrigatório de O-GlcNAc transferase. Esta transferase é uma enzima nuclear e citossólica, que catalisa reversivelmente a modificação pós-tradução de proteínas, pelo qual há a transferência de N-acetil glicosamina [Buse 2006; Kreppel, Blomberg, Hart 1997; Lubas, Frank et al., 1997]. A ativação da via das hexosaminas pela hiperglicemia, resulta em alterações nas funções de proteínas, bem como, na expressão gênica, contribuindo dessa forma para a patogênese de complicações diabéticas. A inibição da enzima GFAT, bloqueia o aumento na transcrição do fator de crescimento transformante beta (TGF beta) [Kolm-Litty, Sauer et al., 1998] e o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (*plasminogen activator inhibitor 1* = *PAI-1*) [Du, Edelstein et al., 2000]. A superfamília TGF beta é constituída por proteínas bem conservadas entre os mamíferos, envolvida numa diversidade de processos, tais como crescimento, diferenciação e apoptose [Derynk, Jarret et al., 1985; Attisano, Wrana 2002]. Três isoformas diferentes de TGF beta foram identificados em mamíferos, TGF beta1, TGF beta2 e TGF beta3 [Derynk, Jarret et al, 1985]. O TGF beta é um fator regulador da transcrição, tradução e modificação pós-tradução de moléculas da matriz extracelular [Mason, Wahab 2003] e está envolvida também, na inibição da síntese da enzima degradadora da matriz [Border, Noble 1994]. A via das hexosaminas está envolvida na bioativação de TGF β em células mesângias induzidas por hiperglicemia [Kolm-Litty, Sauer et al., 1998] (Figura 6.6).

Figura 6.6 - Esquema da via das hexosaminas cujo produto final é a uridina difosfato N-acetil glicosamina



Usando glicosamina, que mimetiza os efeitos de hiperglicemia, esses autores observaram efeitos a nível de transcrição, aumento de mRNA de TGF β 1 e intensificação da produção da proteína TGF β 1. Usando azaserina, um antibiótico produzido por *Streptomyces* ou por síntese, e inibidor de GFAT, os autores verificaram que os efeitos da hiperglicemia eram neutralizados [Kolm-Litty, Sauer et al. 1998]. Outra evidência do envolvimento da via das hexosaminas na nefropatia vem da observação em pacientes diabéticos, que há aumento tanto da mRNA, quanto do próprio TGF β 1 glomerular [Iwano, Kubo et al., 1996]. Contudo, em glândula parótida de ratos diabéticos não foi observado alteração no TGF β 1, mas sim no TGF β 2, que estava aumentada na matriz extracelular [Lamers, Gimenes et al., 2007]. O plasminogênio é uma pró-enzima, que quando clivada por uma enzima chamada uroquinase ou ativador do plasminogênio (uPA), é convertida a plasmina, uma enzima proteolítica. Entende-se por proteólise o processo de degradação de proteínas, isto é, um processo em que enzimas conseguem desfazer a ligação peptídica. A proteólise é um processo importante nas funções fisiológicas e patológicas de um organismo. O sistema de ativação do plasminogênio, PAS (*Plasminogen Activator System*) está envolvido em muitos processos biológicos [Jankun, Aleem et al., 2009a; Jankun, Aleem et al., 2009b; Jankun, Skrzypczak-Jankun 2009; Jankun, Al-Senaïd, Skrzypczak-Jankun 2012]. O PAS inclui: (1) Plasminogênio, uma pró-enzima, ativada por clivagem pela enzima uroquinase, também, chamada ativador do plasminogênio, formando a plasmina, a qual atua sobre proteínas da membrana basal e matriz extracelular. A plasmina é reponsável pela proteólise na remodelação tecidual, invasão tumoral, angiogênese e fibrinólise [Iishi, Tatsuta et al., 1995; Jankun, Al-Senaïdy, Skrzypczak-Jankun 2012]; (2) Ativadores do plasminogênio, uPA (uroquinase) e (tPA) (ativador do plasminogênio tecidual). Estas enzimas atuam sobre o plasminogênio, que com a clivagem proteolítica fornece um segmento e a enzima ativada, isto é, a plasmina. A uPA está envolvida na proteólise pericelular, cicatrização e remodelação tecidual, enquanto a tPA modula a trombose intravascular [Kook, Adamski et al., 1994; Jankun, Al-Senaïdy, Skrzypczak-Jankun et al., 2012]; (3) o sítio de ligação de uPA é o receptor de uPA (uPAR). O receptor é uma glicoproteína de superfície celular que liga uPA sem influenciar a capacidade de atuar sobre o plasminogênio [Berger 2002; Kwan 1992]; (4) Inibidores de ativadores de plasminogênio (PAI). Foram identificados, quatro proteínas como inibidores PAI-1, PAI-2, PAI-3 e a nexina. No entanto, a proteína mais importante é o PAI-1 [Jankun, Skrzypczak-Jankun 2009; Berkenpas, Lawrence, Ginsburg 1995]. Em pacientes chineses diabéticos do tipo 2 foi observado nível elevado de PAI-1 [Ho, Jap 1993], indicando uma possível relação entre o PAI-1 e o diabetes. O mecanismo pelo qual o aumento do fluxo da via das hexosaminas modula a transcrição do gene pela hiperglicemia é ainda um ponto de pesquisa, porém a observação de sítios de ligação para o fator de transcrição do promotor PAI-1 nas células musculares lisas [Chen, Su et al., 1998] sugere, que a modificação covalente do fator de transcrição Sp-1 pela acetilglicosamina, pode explicar a ligação entre a ativação da via das hexosaminas e alteração na transcrição do gene do PAI-1 [Brownlee 2001] (Figura 6.7).

Figura 6.7 - Esquema do sistema de ativação do plasminogênio. uPA = uroquinase; PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio



A forma glicosilada de Sp-1 parece ser mais ativa do que a forma não glicosilada [Kadonaga, Courey et al., 1988].

Neste ponto, acredito ser interessante revermos, mais uma vez, embora de forma sucinta, o dogma central da Biologia Molecular, a fim de conceituarmos alguns termos. O dogma central estabelece que as informações armazenadas no DNA são transferidas para o RNA (transcrição), que por sua vez as transfere para as proteínas (tradução).

DNA - - - - - ► RNA - - - - - ► PROTEÍNAS

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a biomolécula, que o organismo usa para o armazenamento de informações. Essas informações são passadas para o ácido ribonucleico (RNA) e deste para as proteínas. A informação genética armazenada no DNA é transmitida ao RNA por um processo chamado transcrição. Transcrição é um esforço combinado entre a ligação de fatores de transcrição às sequências específicas do DNA e polimerase II, formando um complexo, resultando no início da transcrição [Tjian, Maniatis 1994]. A informação transmitida do RNA para as proteínas é chamada tradução. Nesses processos, para fins de clareza, vamos conceituar alguns termos usados nesta área. Assim, por exemplo, entendemos por cromossomo uma estrutura que consiste em cordas de cromatina. Cromatina, por sua vez, é um complexo de DNA e proteínas. Gene é um segmento cromossomal, responsável pela codificação de um polipeptídeo ou molécula de RNA, incluindo introns e exons. Exon é uma parte do gene, ou melhor um segmento do DNA codificante (que leva as informações), que está presente no mRNA (RNA mensageiro) e na sequência de amino ácidos de sua proteína. Já, o intron é um segmento do DNA, não codificante (sem informações), que é transcrito, mas posteriormente é removido do transcrito primário por “*splicing*”. *Splicing* é o processo de remoção dos introns, durante a formação do mRNA. Um agrupamento de genes em unidades é conhecido como operon. Sítio promotor, por sua vez consiste em uma pequena extensão da sequência do DNA, que são reconhecidos por uma variedade de proteínas específicas ligadoras de DNA, que regulam a transcrição. [Yang 1998]. É o local no qual a enzima RNA polimerase se liga para iniciar o processo de transcrição daquele gene (polimerização do RNA). Portanto, o termo transcrição refere-se ao processo, pelo qual as informações armazenadas no DNA são passadas para o RNA (síntese), enquanto a tradução refere-se ao processo pelo qual as informações carregadas pelo RNA são usadas para a síntese de proteínas específicas. A síntese de proteínas tem lugar nos ribossomos, partículas citoplasmáticas esferoidais, compostos por duas subunidades, uma maior apresentando um coeficiente de sedimentação de 60S (S de unidade Svedberg de sedimentação), enquanto a subunidade menor apresenta um coeficiente de sedimentação de 40S. Fatores de transcrição de eucariotos são proteínas modulares, que utilizam domínios distintos para ativação ou repressão transcritiva e ligação ao DNA. A interação específica entre um determinado fator de transcrição e sua sequência cognata, forma a base para a caracterização bioquímica de proteínas reguladoras [Yang 1998]. SP.1 é um fator de transcrição identificado na década de 1980, purificado e clonado, tendo sido caracterizado em células de mamíferos [Dyran 1983]. Os fatores de transcrição frequentemente são baseados em motivos estruturais, que constituem seu domínio de ligação ao DNA. Em muitos casos a proteína faz um grande número de contatos com o DNA, envolvendo ligações de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas [Yang 1998]. O aumento da expressão do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), induzido pela hiperglicemia, ocorre pelo aumento da glicosilação do fator de transcrição SP-1 [Du, Edelstein et al., 2000]. Portanto, a hiperglicemia induz o aumento na atividade do promotor PAI-1, sendo o fator de transcrição o elemento responsivo. O aumento do fluxo das hexosaminas aumenta a glicosilação do fator de transcrição SP-1, de modo que o aumento da atividade do promotor poderia ser um reflexo da ligação de SP-1 [Du, Edelstein et al., 2000].

VIA DE FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO

AVANÇADA

A formação de produtos finais de glicação avançada, AGEs, (*Advanced Glycation Endproducts*) representa uma das vias importantes relacionadas com as complicações de diabetes. A hiperglicemia crônica é considerada uma das causas da formação de AGEs e de espécies reativas de oxigênio [Brownlee 2005]. Esses compostos além de sua formação endógena, também pode originar de fontes exógenas.

FONTES EXÓGENAS

TABACO: Evidências experimentais mostram que os fumantes de tabaco apresentam aumentada concentração de AGEs no cristalino e vasos sanguíneos [Nicholl, Bucala, 1998a]. Os produtos tóxicos do cigarro, conhecidos com glicotoxinas chegam aos alvéolos pulmonares são transferidos ao parênquima pulmonar e sangue onde reagem com proteínas da parede vascular [Cerami, Founds et al., 2015]. As glicotoxinas do tabaco induzem a formação de AGEs em poucas horas, diferentemente do que ocorre com o AGE endógeno [Nicholl, Bucala 1998b].

ALIMENTOS: O aroma e a textura de alimentos processados contribuem para a formação de AGEs. Os alimentos derivados de animais, contém certa quantidade de AGEs, que aumenta com o tratamento pelo calor [Goldberg, Cai et al., 2004; Uribarri del Castilo et al., 2015, O'Brien, Morrissey 1989; Goldberg, Cai et al., 2004].

FORMAÇÃO DE AGEs

Os produtos não enzimáticos de glicação e oxidação de proteínas, os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são formados predominantemente sobre os grupos lisina e arginina de proteínas. Na formação de AGEs dois compostos dicarbonilas principais são os precursores chave, a saber: 3-desoxiglicosona e metilglioxal [Thornalley, Langborg, Minhas 1999]. A formação de AGEs ocorre através de uma reação espontânea entre açúcares redutores e o grupo amino de proteínas, chamada glicação. Neste ponto é importante conceituarmos os termos glicosilação e glicação, que muitas vezes são usados como sinônimos. A distinção entre esses dois termos foi estabelecida numa revisão da literatura publicada em 1993 [Lis, Shanon 1993]. Glicosilação é o processo enzimático de modificação de proteínas por sacarídeos formando glicoproteínas, enquanto glicação é a modificação não enzimática de proteínas por sacarídeos, formando proteínas glicadas. Portanto, a glicosilação é uma reação catalisada por enzimas, pelo qual grupos de carboidratos são ligados por ligação covalente às proteínas, formando então as glicoproteínas. Ligação covalente é aquela que ocorre entre dois átomos por emparelhamento de elétrons, de modo que os átomos compartilham o par de elétrons (um elétron de cada átomo). Quando o par de elétrons é compartilhado igualmente pelos dois átomos, a ligação é apolar; se por outro lado, o compartilhamento for desigual, em virtude da maior eletronegatividade de um deles, a ligação é polar. A glicosilação é um processo, que altera as propriedades das proteínas, tais como a solubilidade, estabilidade e massa física. A fração de carboidrato da molécula glicoproteica pode constituir-se num sinal de reconhecimento, capaz de direcionar as interações proteicas. As enzimas responsáveis pela glicosilação, pertencem a uma classe de enzimas denominadas transferases (por exemplo a glicosiltransferase). Nas glicoproteínas, o carboidrato é ligado ou a um grupo aminico (-NH₂) do resíduo de uma cadeia lateral, denominado ligação-N (*N-linked*) ou

a um átomo de oxigênio (de serina ou treonina) denominado ligação-O (*O-linked*). A glicosilação ocorre no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi.

Como vimos acima, glicação é um processo não enzimático, que ocorre espontaneamente entre um oxigênio aldeídico e um grupo amina terminal (-NH₂) de uma proteína. A glicação não ocorre quando o grupo aldeído ou cetona estão envolvidos em ligações glicosídicas. A glicação é um processo complexo chamado reação de Maillard. Foi esse pesquisador, que descreveu a reação não enzimática entre glicose e glicina pelo aquecimento, de modo que a condensação de um grupo carbonila (-CO-) com um grupo N-terminal ou um grupo amínico livre de proteína é conhecida como reação de Maillard [Huijberts, Schaper, Schalkwijk 2008; Rabbani, Thornalley 2012]. A formação de AGEs é subdividido em três estágios: o primeiro ou estágio prematuro forma-se os produtos Amadori, o segundo ou estágio intermediário os produtos Amadori são transformados em carbonilas reativas e o terceiro ou estágio tardio as carbonilas reativas dão origem ao produtos finais de glicação avançada, AGEs [Sruthi, Raghu 2020]. Forma-se inicialmente um composto que recebe o nome de base de Schiff. Chama-se base de Schiff o composto formado pela condensação de uma amina primária com aldeído. A hemoglobina glicada (HbA1c) é um bom exemplo da reação de Maillard (Figura 6.8). A HbA1c é o resultado de uma reação não enzimática, espontânea, entre a glicose e o grupo amino (-NH₂) terminal da valina na cadeia beta da hemoglobina A. Primeiramente caracterizada como hemoglobina glicada [Bookchin, Gallop 1968], foi relatado o seu aumento no diabetes [Rahbar 1968], agora é utilizada para monitorar o controle glicêmico de pacientes diabéticos [Koenig, Peterson et al., 1976]. A hemoglobina de várias espécies, diferem em algumas propriedades como solubilidade, afinidade ao oxigênio, contudo todas são compostas de uma proteína a globina, combinada não covalentemente com um grupo prostético, a ferroprotoporfirina. Grupo prostético é uma porção não proteica, que forma uma parte funcional da proteína. As ferroprotoporfirinas são compostos de 4 anéis pirrólicos ligadas por pontes (=C-). Quatro cadeias polipeptídicas formam a hemoglobina, sendo que duas delas (cadeias alfas) apresentam a mesma sequência de amino ácidos, porém diferentes da sequência das outras duas cadeias (cadeias betas), que são iguais entre si.

Figura 6.8 - Hemoglobina glicada como exemplo de formação de base de Schiff. Hb = hemoglobina; HbA1c = hemoglobina glicada



Cada cadeia polipeptídica é ligada a um grupo prostético de ferroprotoporfirina. Na ligação do oxigênio a molécula da hemoglobina, os quatro sítios ativos (ferroprotoporfirinas) atuam de maneira cooperativa, isto é, a hemoglobina apresenta propriedades alostéricas, de modo que quando um oxigênio se liga ao sítio ativo (heme) há uma alteração conformacional na molécula, de modo a permitir a ligação dos outros três oxigênios, mais facilmente. A hemoglobina humana adulta (HbA1) é formada por 2 cadeias polipeptídicas alfas e duas cadeias polipeptídicas betas.

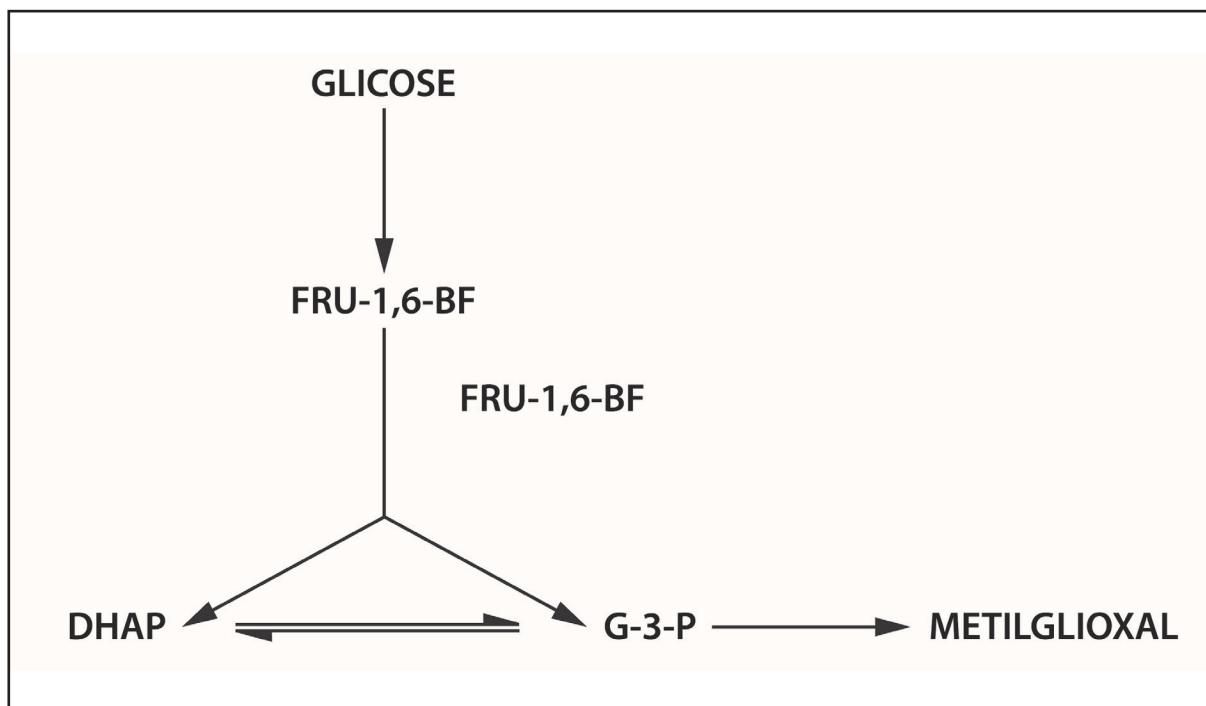
A cadeia alfa é constituída por 141 amino ácidos, enquanto a cadeia beta por 146 amino ácidos. As cadeias alfas apresentam a mesma sequência de amino ácidos, porém diferem das cadeias beta na sequência de aminoácidos.

A hemoglobina fetal (HbF), contém duas cadeias alfas e duas cadeias gamas, que são diferentes da sequência das cadeias beta. Por outro lado, há uma forma de hemoglobina humana adulto, que constitui cerca de 2% da hemoglobina normal. É a hemoglobina A2 (HbA2). É preciso ressaltar que ainda existem outras hemoglobinas humanas mutantes. A base de Schiff é um composto lábil. Normalmente, a forma acíclica da glicose ou outro sacarídeo, reage de forma reversível com o grupo amino livre de um resíduo de aminoácido da cadeia polipeptídica ou então com o N-terminal, formando a base de Schiff. No equilíbrio entre a base de Schiff e os reagentes, estima-se que a base de Schiff representa cerca de 0,3% da concentração de glicose [Baynes, Thorpe, Murtiashaw 1984]. A base de Schiff leva horas para ser formada, e uma vez formada, ela pode sofrer rearranjos para uma forma mais estável, o produto Amadori. Pelo fato da glicação de proteínas ser uma reação química espontânea, ela depende do grau e duração da hiperglicemia, da meia vida das proteínas e da permeabilidade do tecido a glicose livre. Produtos finais de glicação avançada, constituem um grupo heterogêneo, produzidos endogenamente, a partir de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos [Vlassara, Palace 2002; Baynes 2002].

AGEs formados a partir da peroxidação de lipídeos, recebem o nome de produtos finais de lipoxidação avançada (ALEs) [Bucala, Makita et al., 199; Miyata, Saito et al., 2000]. Aproximadamente, 10% dos níveis em AGEs derivados de alimentos, são absorvidos e correlacionados aos níveis de AGEs circulantes e teciduais [Koschinsky, He et al., 1997].

As proteínas glicadas podem sofrer reações posteriores envolvendo intermediários dicarbonilas, tais como 3-deoxiglicosona, originando produtos finais de glicação avançada (AGEs) [Ahmed 2005; Huijberts, Schaper, Schalkwijk 2008]. Tanto a glicosona, quanto a 3-deoxiglicosona (3-DG) são derivadas da glicose. Sob o ponto de vista mecanístico a glicosona e a deoxiglicosona são formadas por uma fase inicial de ativação, desprotonização do carbono 2, redistribuição da densidade de elétrons entre os carbonos 1 e 2, formando o 1,2 enediol, que dá origem a glicosona; alternativamente, a redistribuição da densidade de elétrons entre os carbonos 2 e 3 leva a desidratação formando o 2,3enol dando origem a 3-deoxiglicosona [Thornalley, Langborg, Minhas 1999]. Por outro lado, o glioxal além da formação via glicólise é também formada da peroxidação lipídica e o metilglioxal pela fragmentação de trioses fosfatos e catabolismo de corpos cetônicos e treonina [Thornalley, Langborg, Minhas 1999]. Já vimos, que uma vez dentro da célula, a glicose sofre um processo de fosforilação, uma reação catalisada por uma quinase, a hexoquinase, fornecendo a glicose-6-fosfato (G-6-P), tendo como cofator a adenosina trifosfato (ATP). A glicose-6-fosfato através de algumas reações é transformada a frutose-1,6-bisfosfato, que é clivada produzindo 2 moléculas com 3 átomos de carbono, o gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) e a dihidroxiacetona fosfato (ADHAP). A reação é catalisada pela enzima aldolase. Durante o processo de clivagem forma-se um intermediário, base de Schiff, entre o grupo amino da enzima e o grupo carbonila da Fru-1,6-P2. Os produtos formados, pela clivagem da Fru-1,6-P2, o gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) e a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) estão em equilíbrio, numa reação catalisada por uma isomerase, a triose fosfato isomerase (TPI). O Gliceraldeído-3-fosfato pode então ser transformado a glioxal e metil glioxal. A reação de glicação não enzimática ou como é conhecida, reação de Maillard, ocorre em estágios, os quais envolvem uma série complexa de reações de oxidação, desidratação e ciclização, dando origem aos AGEs endógenos, compostos instáveis que se acumulam, principalmente em proteínas de vida longa. Também, tem sido descrito, que os AGEs podem ser formados com proteínas de vida curta [Brownlee 2005; Lapolla, Brioschi, Banfi et al., 2008; Chilelli, Burlina, Lapolla 2013] (Figura 6.9).

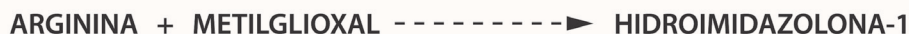
Figura 6.9 - Esquema da formação de metil glioxal de trioses fosfatos. ALD = aldolase; TPI = triosefosfato isomerase; FRU-1,6 BF = Frutose-1.6-bisfosfato; DHAP = Dihidroxiacetona fosfato; G-3-P = gliceraldeído-3-fosfato



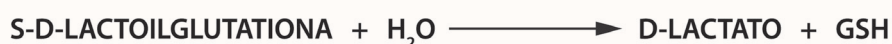
As moléculas precursoras de AGEs podem atuar fora das células, pois elas tem capacidade para se difundir. Fora da célula, esses precursores podem reagir com proteínas da matriz extracelular modificando-as [McLellan, Thornalley et al., 1994]. Modificadas, essas proteínas alteram o processo de sinalização entre a matriz extracelular e a célula, causando uma disfunção celular [Charonis, Reger et al., 1990]. Outras proteínas que podem ser modificadas pelas moléculas de precursores são as circulantes. Assim, a albumina do sangue quando modificadas, podem se ligar aos receptores de AGEs, e ao ativá-los causam a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, com a consequente patologia vascular [Abordo, Thornalley 1997; Doi, Vlassara et al., 1992]. Durante a hiperglicemia há acúmulo de precursores dicarbonilas reativas ou de glicoxidação (glicação acompanhada de oxidação) ou então de produtos de lipoxidação, e isto é conhecido como estresse carbonílico [Miyata, van Ypersele-de-Strihou et al., 1999; Suzuki, Miyata et al., 1999]. Logo, podemos dizer que o estresse dicarbonílico só ocorre quando metabólitos dicarbonilas (metilglioxal e 3-deoxiglicosona) se acumulam, devido a aumentada produção ou então devido a uma reduzida detoxificação. Esta condição tóxica foi associada a moléstias metabólicas e moléstias relacionadas ao envelhecimento, ambos caracterizados por estados pró-inflamatórios e pró-oxidativos [Nigro, Leone et al., 2019]. O termo estresse carbonílico ou dicarbonílico é usado, sem levar em consideração, se o acúmulo de precursores, carbonílicos formam AGEs oxidativos, como carboximetil lisina (CML) e pentosidina ou se formam AGEs não oxidativos como o dímero deoxiglicosona-lisina (DOLD) e o dímero metilglioxal-lisina (MOLD) [Frye, Degenhardt et al., 1998].

Quando a glicação é acompanhada de oxidação, os produtos formados são conhecidos como produtos de glicoxidação. Carboximetil lisina e pentosidina são exemplos desses produtos [Bierhaus, Hofmann et al., 1998; Miyata, Maeda et al., 1997]. Muito embora sejam relatados baixos níveis nos tecidos, as dicarbonilas são compostos muito mais reativos do que a glicose.

Assim, a hidroimidazolona-1, um derivado do metilglioxal é formado rapidamente a partir da reação do metilglioxal com o grupo guanidino do resíduo arginina [Lo, Westwood et al., 1994] (Figura 6.10).

Figura 6.10 - Esquema da formação da hidroimidazolona-1

O aduto hidroimidazolona é o AGE mais importante nos sistemas fisiológicos, tanto quantitativamente, sendo constituídos por cerca de 90% de aduto do metilglioxal, quanto funcionalmente. Entre as implicações funcionais da glicação pelas dicarbonilas com o resíduo arginina, está a provável localização do resíduo num sítio de proteínas [Gallet, Charlotteaux et al., 2000], de modo que sua glicação induz a perda de carga positiva (do grupo guanidino), resultando inativação e disfunção da proteína [Ahmed, Dobler et al., 2005; Nigro, Leone et al., 2019]. O metilglioxal é metabolizado pelo sistema glioxalase. O sistema glioxalase é um sistema enzimático citoplasmático, consistindo de glioxalase 1 (GL1) e glioxalase 2 (GL2) e atua tendo como cofator a glutatona. Está presente em todas as células de mamíferos e catalisa a transformação do metilglioxal para lactato [Thornalley PJ 1993] (Figura 6.11).

Figura 6.11 - Esquema da formação de D-lactato a partir do metilglioxal

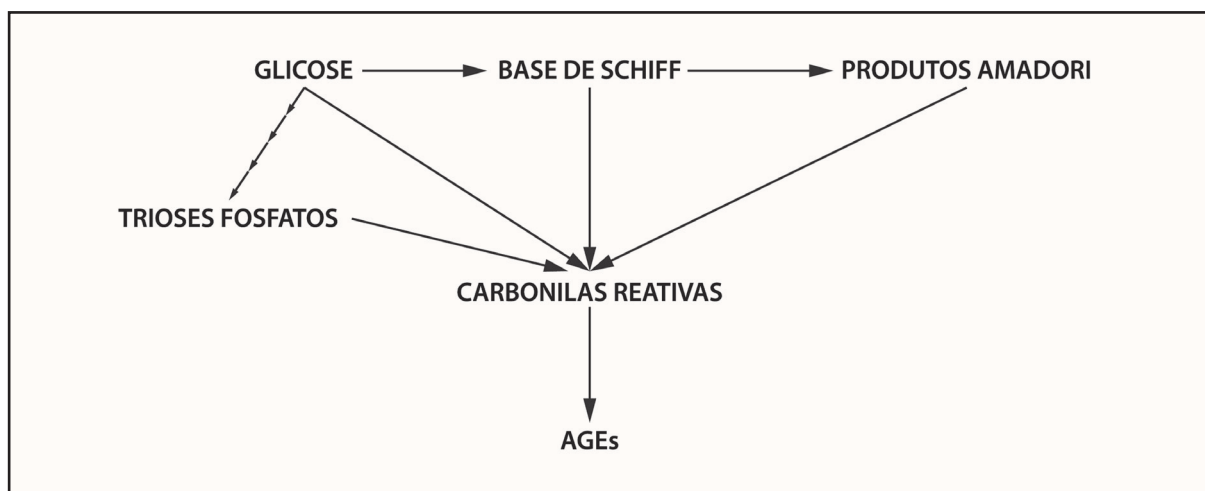
A GL-1 pertence a um grupo de enzimas chamadas liases. As liases catalisam reações de clivagem carbono-carbono, como também catalisam a formação de ligação C-N. Em outras palavras, as liases são enzimas envolvidas na hidrólise de compostos. Tanto os produtos finais de glicação avançada, quanto seus precursores estão implicados no desenvolvimento de doenças crônicas.

RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

O receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína multiligante pertencente a família das imunoglobulinas, que consegue reconhecer uma variedade de ligantes diferentes aos quais faltam similaridade sequencial [Fritz 2011]. A proteína consiste em 404 resíduos de aminoácidos com um peso molecular de cerca de 55 KD. Apresenta um domínio extracelular de três domínios semelhantes a imunoglobulina, um V (variável) tipo domínio IG, seguido por dois C (constante) tipo domínio IG, tendo ainda um domínio transmembrana e outro curto citoplasmático [Neeper, Schmidt et al., 1992]. O domínio citoplasmático ativado é um requisito para a sinalização dependente de RAGE. Existe a forma solúvel de RAGE na circulação aos quais faltam o domínio transmembrana e servem de armadilha para ligantes de RAGE [Sruthi, RAGHU 2021]. A cascata de sinalização AGE-RAGE tem sido implicado em muitas doenças como diabetes, inflamação crônica, aterosclerose e câncer [Fritz 2011]. A formação de do complexo AGE/RAGE, com a consequente ativação do receptor (RAGE), promove a ocorrência de eventos, como a produção de espécies reativas de oxigênio pela enzima

NADPH oxidase, o qual por sua vez ativa o fator de transcrição nuclear κB (NF- κB). Uma vez ativado, esse fator induz a transcrição de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa e a interleucina-6, bem como de outros fatores como endotelina-1, fator de crescimento endotelial vascular, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). O fator de necrose tumoral alfa suprime a síntese de triacilglicerol, inibe a lipase lipoprotéica, estimula a lipólise e inibe a liberação de insulina. A interleucina-6 estimula a síntese de fibrinogênio, fatores de coagulação e macroglobulina α_2 , que pode ser de defesa contra lesão e infecção. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) induz a angiogênese, isto é, células endoteliais de vasos sanguíneos a migrar e proliferar para formar novos vasos. Do que foi acima abordado podemos esquematizar a seguinte figura 6.12.

Figura 6.12 - Esquema das vias de formação de produtos finais de glicação avançada



VIA DE ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE C

Já vimos anteriormente, que múltiplas vias bioquímicas têm sido consideradas para explicar os efeitos danosos, que o aumento persistente da concentração de glicose nas células, exerce no desenvolvimento de complicações de diabetes. Entre os mecanismos propostos para explicar esses efeitos, a via de ativação da proteína C, tem sido considerada uma via importante [Koya, King 1998; Gerald, King 2010]. A proteína quinase C (PKC) compreende uma superfamília de enzimas quinases (enzimas responsáveis pela fosforilação de substratos), serina/treonina dependente de fosfolipídeos, que pertencem a superfamília AGC (proteína quinase A, G e C) [Nishizuka 1995]. Tomando por base os requisitos para cofatores e lipídeos, as várias isoformas de PKC foram classificadas em três subgrupos, a saber: proteínas quinases convencionais (cPKC) proteínas quinases novas (nPKC) e proteínas quinases atípicas (aPKC) [Newton 1997]. As proteínas quinases convencionais (cPKC α , cPKC β 1, cPKC β 2 e cPKC γ) são reguladas por diacilglicerol (DAG) que liga a um dos dois módulos C1, e Ca^{2+} que liga ao domínio C2. Em 1986 os cPKCs foram clonados e foi observado que na sua estrutura havia domínios similares consistindo dos domínios C1, C2, C3 e C4 intercalados com regiões variáveis, V1-V5. Esta estrutura define a subfamília de PKC convencional [Coussens, Parker et al., 1986, Knopf, Lee et al 1986, Parker, Coussens et al 1986]. As novas proteínas quinases (nPKC δ , nPKC ϵ , nPKC η nPKC θ) são reguladas pelo diacilglicerol (DAG) que também liga a um dos domínios C1. Embora as isoenzimas nPKCs, também, tenham um domínio C2, em virtude da ausência do resíduo ácido aspártico, necessário para coordenar o Ca^{2+} , ele não é um sensor de Ca^{2+} , [Newton 2018a]. As proteínas quinases atípicas (aPKC ζ e aPKC i/λ) não respondem nem ao DAG e nem ao Ca^{2+} , faltam-lhes um segundo domínio C1 e C2 e são ativados pelo fosfoinositideo trifosfato (PIP3) [Newton 2018a]. Na representação esquemática da estrutura modular das isoenzimas

de proteínas quinases C, nota-se a presença de dois domínios, o domínio catalítico, situado no C-terminal (extremidade com o grupo carboxílico livre) e o domínio regulador, localizado no N-terminal (extremidade com o grupo amino livre). O domínio catalítico é um domínio comum aos três subgrupos de proteínas quinases C. Ele apresenta um módulo (C4) onde se dá a ligação do substrato e outro módulo (C3) responsável pela ligação com o ATP. O domínio regulador apresenta um módulo (C2) sensível ao Ca_2^+ . O Ca_2^+ liga a um resíduo de ácido aspártico, que localiza o domínio para a membrana plasmática via fosfolipídeos [Nalefski, Wisner et al., 2001; Igumenova 2015; Newton 2018b].

As isoenzimas de PKC novas não têm o domínio C2, mas sim um domínio semelhante a C2, que não serve como sensor para Ca^{2+} ou membrana plasmática. No domínio regulador de todas as isoenzimas de PKC existe um ou dois domínios C1 com afinidade para diacilglicerol, baixa para os PKCs convencionais, alta para as PKCs novas e nenhuma para as PKCs atípicas. As isoenzimas convencionais e novas apresentam um domínio C1 dividido em dois módulos (C1A e C1B) ligados entre si. Somente um domínio é que liga o diacilglicerol [Kikkawa, Tanaka et al., 1983]. A afinidade do domínio C1B para diacilglicerol é diferente para as isoenzimas. Esse domínio, também liga ésteres de forbol, que são ativadores de PKCs, mas são também, promotores efetivos de tumor, isto é, por si só não são cancerígenos, porém aumentam a potência de cancerígenos conhecidos. As proteínas quinases C novas não são sensíveis ao Ca^{2+} , pois faltam-lhes o domínio C2, que é o responsivo ao Ca^{2+} . No domínio regulador tem um segmento chamado pseudosubstrato, comum a todas as isoenzimas dos subgrupos. O pseudosubstrato é considerado um interruptor molecular na regulação das isoenzimas. Ele compreende, um segmento, com aminoácidos básicos lembrando um consenso da sequência do substrato, porém, com uma alanina no lugar do fosfo acceptor [House, Kemp 1990]. Nas isoenzimas PKC atípicas há um domínio PB1, responsável pela modulação com proteínas andaimes (*scaffold*). Essas isoenzimas são constitutivamente ativas quando ligadas as proteínas andaimes, via interação com o domínio PB1 [Graybill, Wee et al., 2012; Tsai, Xie et al., 2015; Tobias, Newton 2016]. Proteínas andaimes são aquelas moléculas, que coordenam os eventos de sinalização dependente de estímulo. São moléculas, que podem ligar um ou mais efetores de sinalização para sua localização espacial e temporal dentro da célula [Mugabo, Lim 2018]. Essas proteínas podem ser definidas como proteínas, que organizam complexos de sinalização, ligando juntos pelo menos 2 enzimas de sinalização, promovendo sua comunicação pela proximidade. Classicamente, eles têm sido considerados plataformas passivas para a montagem do complexo de sinalização, mas também desempenham papel regulador [Buday, Tompa 2010].

PROTEÍNA QUINASE C LATENTE

Nas isoformas das proteínas quinases C, em suas formas latentes, o segmento conhecido como pseudosubstrato, localizado no N-terminal inibe o sítio ativo, do domínio catalítico. A existência do pseudosubstrato, constitui um fator importante para a regulação das isoformas de proteínas quinases C.

Logo após serem sintetizadas, as isoformas de PKCs sofrem uma série de fosforilações ordenadas, para fornecer uma enzima estável e preparada para responder ao segundo mensageiro. Recém sintetizada, a enzima apresenta-se numa conformação aberta, com módulos expostos e o pseudo substrato ainda não ligado ao sítio ativo da quinase. Ela é então processada por três fosforilações ordenadas [Gould, Kannan et al., 2009] e uma vez completamente fosforilada a enzima sofre uma transição conformacional para uma conformação auto inibida, em que o pseudo substrato se insere na cavidade ligadora do substrato, mascarando os seus domínios C1 e C2 [Newton 2018]. Evidências experimentais, apontam para a existência de interações

intramoleculares entre os domínios C1 e C2, bem como entre C2 e o domínio V5 do C-terminal, os quais contribuem para a estabilização da forma latente [Stahelin, Wang et al., 2005]. O domínio C1 intacto é crucial para a auto inibição, especialmente o C1A que imediatamente segue o segmento pseudo substrato [Sommese, Ritt et al., 2017]. Também, pode existir interações intermoleculares. A homodimerização de enzimas convencionais, foi demonstrado usando um reagente seletivo para grupos sulfidrilas, para demonstrar ligações cruzadas [Huang, Leventhal et al., 1999].

ATIVACÃO DE PROTEÍNA QUINASE C

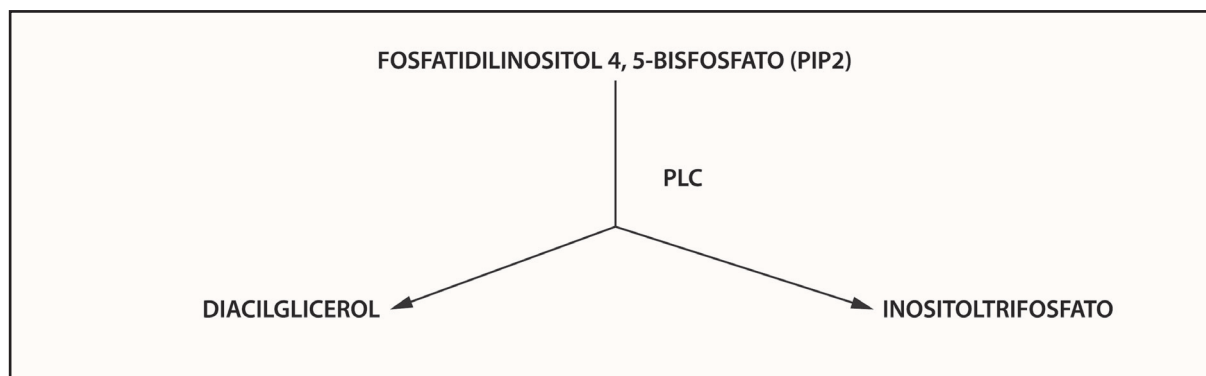
As isoformas de PKC requerem a fosforilação do aceptor de fosfato serina/treonina, para serem ativadas. As proteínas quinases são fosforiladas em três sítios de fosforilação funcionalmente distintos do domínio catalítico e as sequências ao redor de serina/treonina são conservadas entre os PKCs [Keranen, Dutil, Newton 1995; Parekh, Ziegler, Parker 2000]. A fosforilação desses sítios é uma etapa necessária para que a enzima possa ligar o diacilglicerol e ser por ele ativado [Keranen Dutil et al., 1995; Bornancin, Parker 1997]. A primeira fosforilação se dá na sequência da alça de ativação e se constitui num requisito para o realinhamento correto dos resíduos do sítio ativo. Essa fosforilação se deve a catálise de uma quinase dependente de fosfoinosítídeo-1, PDK-1 (*Phosphoinositide Dependent Kinase -1*), que fosforila os PKCs na alça de ativação [Toker, Newton 2000; Cenni, Doppler et al., 2002]. De acordo com um modelo de ativação corrente, a interação do domínio C2 com a membrana contendo fosfatidil-serina, constitui a primeira etapa na sequência de ativação. Esta interação facilita o rearranjo intramolecular da proteína quinase C, tornando os sítios de ligação C1A e C1B acessíveis ao diacilglicerol [Antal, Violin et al., 2014; Ziemba, Li et al., 2014]. A interação de C1B com diacilglicerol pode iniciar a liberação da região do pseudo substrato do sítio ativo da quinase.

INOSITOLTRIFOSFATO e DIACILGLICEROL

A ativação de isoenzimas pode ocorrer quando agonistas, como alguns hormônios, alguns fatores de crescimento, neurotransmissores, ligam aos respectivos receptores e ativam membros da família fosfolipase C, que geram os segundos mensageiros inositoltrifosfato e diacilglicerol.

Neste ponto, poderíamos fazer a seguinte pergunta: o que são segundos mensageiros? Segundos mensageiros são moléculas pequenas e íons que transferem os sinais recebidos pelos receptores de superfície celular para efetores proteicos. Incluem uma variedade de espécies químicas com diversas propriedades para permitir que sinalizem dentro da membrana, por exemplo, moléculas hidrofóbicas, como lipídeos e derivados de lipídeos, dentro do citossol, como por exemplo, moléculas polares como íons e nucleotídeos [Newton, Bootman, Scott 2016]. A ligação do ligante ao receptor altera a conformação tridimensional do receptor (estrutura terciária) estimulando efetores proteicos a catalisarem a produção de segundos mensageiros. Estes, rapidamente se difundem para encontrar a proteína alvo, em qualquer lugar da célula, alterando sua atividade como resposta à informação recebida [Newton, Bootman, Scott 2016]. Muitos sinais vindos de fora da célula iniciam a hidrólise de lipídeos para gerar os segundos mensageiros. Assim, os receptores acoplados a proteína G (GPCPs) e os receptores tirosina quinases (RTKs) podem atuar na ativação da enzima fosfolipase C, enzima que cliva os fosfolipídeos gerando inositol trifosfato e diacilglicerol (Figura 6.13). Essa hidrólise é mediada por proteínas G acopladas aos receptores. O IP₃ é uma molécula solúvel em água, que se difunde, liga ao receptor específico do retículo endoplasmático, causando a liberação de Ca²⁺ para o citossol. O Ca²⁺, também estimula uma variedade de processos, os quais são mediados pela calmodulina.

Figura 6.13 - Esquema da formação de inositol trifosfato e diacilglicerol a partir de PIP2. PLC-Fosfolipase



A calmodulina é uma proteína ligadora de cálcio, que apresenta 4 sítios de ligação com o cálcio, sendo dois de alta afinidade e dois de baixa afinidade. Quando a proteína liga os dois cálcios no sítio de alta afinidade, ele sofre uma alteração conformacional facilitando a ligação dos outros dois sítios com o cálcio. Após a ligação do Ca^{2+} no domínio C2, o diacilglicerol liga no domínio C1 aumentando a afinidade de PKCs a lipídeos de membrana, induzindo alterações conformacionais, que leva à forma catalítica competente. Os PKCs novos como são independentes de Ca^{2+} , são ativados diretamente pelo DAG [Giogi, Agnoletto et al.,2010].

Quando os níveis citossólicos de cálcio forem altas, o cátion pode atuar diretamente na fosfolipase C, promovendo a ativação de PKC, na ausência da ativação do receptor. Modificações pós-tradução podem levar a ativação de seletos isoenzimas de PKC, tanto no estado normal quanto na doença [Steinberg 2008; Mochly-Rosen, Das, Grimes 2012]. Por outro lado, o diacilglicerol pode ser sintetizado por um processo chamado “de novo”. Nesta modalidade de síntese, o diacilglicerol é sintetizado a partir de compostos simples. A ativação persistente e excessiva de várias isoformas de PKC, opera uma via comum, modulando lesões de tecidos, por espécies reativas de oxigênio (ROS). Isto, resulta primariamente na intensificação da síntese de novo do diacilglicerol a partir da glicose, via trioses fosfatos, cuja disponibilidade aumenta em razão do aumento de espécies reativas de oxigênio, que inibe a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aumentando dessa forma, os níveis intracelulares de precursors de DAG [Inoguchi, Battan et al., 1992; Craven, Davidson, De Rubertis 1990; Scivittaro, Ganz, Weiss, 2000]. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G-3-PD), catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato para 1,3-bisfosfato glicerato. A inibição dessa enzima interrompe o fluxo glicolítico, aumentando, por conseguinte, os níveis de trioses fosfatos. Como o gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxiacetona fosfato estão em equilíbrio, numa reação catalisada pela triosefosfato isomerase, a dihidroxiacetona fosfato é desviada para a síntese de diacilglicerol (síntese de novo). A sinalização de PKC efetivamente termina quando os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} se reduzem e o DAG é fosforilado.

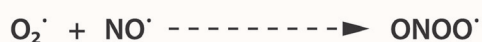
ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES

Embora exista um capítulo sobre estresse oxidativo, acreditamos que sua conceituação, neste momento, possa nos ajudar a entender a relação que há entre radicais livres-estresse oxidativo-diabetes: estresse oxidativo é um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes [Sies, Berndt, Jones 2017], ou é uma situação desbalanceada em que níveis excessivos de radicais livres de oxigênio estão presentes no corpo, devido a uma inadequada disponibilidade de agentes neutralizantes, os antioxidantes [Opara 2006] ou ainda, é uma situação, quando a concentração de espécies reativas de oxigênio do equilíbrio dinâmico é transitória ou cronicamente intensificada, perturbando o

metabolismo celular e sua regulação, lesionando os constituintes celulares [Lushchak 2014a] ou ainda, estresse oxidativo é a consequência do uso do oxigênio na respiração aeróbica pelos organismos vivos e é marcado como uma condição persistente, de um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade do sistema antioxidante endógeno de detoxificá-los [Moldogazieva, Mokhosoev et al., 2019]. Sob o ponto de vista químico, um radical livre é qualquer átomo ou molécula ou parte dela (partícula) que possui um elétron excitado não pareado (compartilhado) na orbital externa da molécula ou átomo. Já, em biologia, os radicais livres são considerados uma partícula (átomo ou molécula ou parte dela) que possui elétrons não pareados na orbital externa do átomo ou molécula [Halliwell, Gutteridge 1989]. Na década de 1950, os radicais livres foram identificados em sistemas biológicos [Commoner, Townsend, Pake 1954], fato que logo chamou a atenção dos pesquisadores para estudos em patologias humanas [Gerschman, Gilbert et al., 1954]. Os radicais livres são derivados ativos da molécula de oxigênio (O_2), são as espécies reativas de oxigênio, superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), e de moléculas de nitrogênio, são as espécies reativas de nitrogênio, peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) [Halliwell, Gutteridge 2015]. Pelo fato de possuírem elétrons não pareados na última camada, eles podem ligar outras biomoléculas modificando-as [Staveness, Bosque, Stephenson 20116; Radi, Denicola et al., 2018]; Yaribeygi, Sathyapalan et al., 2020]. As espécies reativas de oxigênio são formadas, principalmente, nas mitocôndrias, durante a passagem de elétrons na cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória). Como já vimos anteriormente, a mitocôndria é uma organela que apresenta dois sistemas de membranas, uma externa composta de 30-40% de lipídeos e 60-70% de proteínas, e outra interna que consiste de 80% de proteínas e é rica em ácidos graxos insaturados. Portanto, existem, na mitocôndria, dois compartimentos, um representado pelo espaço inter-membrana e outro compartimento representado pela matriz, que é ligada a membrana interna. Na membrana interna estão localizados, o complexo enzimático de transporte de elétrons e o da fosforilação oxidativa, bem como vários sistemas de transportes, envolvendo a movimentação de substratos e outros compostos, entre citossol e a matriz. Durante a passagem de elétrons através dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória, a energia liberada é usada para bombear prótons (H^+) da matriz para a membrana interna, estabelecendo, assim um gradiente de prótons. A transferência de elétrons do agente redutor para o agente oxidante é expressa como potencial redox, é medida em volt e é conhecida como força eletromotriz. A energia, estocada no gradiente de prótons e na força eletromotriz, guia a síntese de ATP, pelo movimento de volta de prótons, através da enzima ATP sintase.

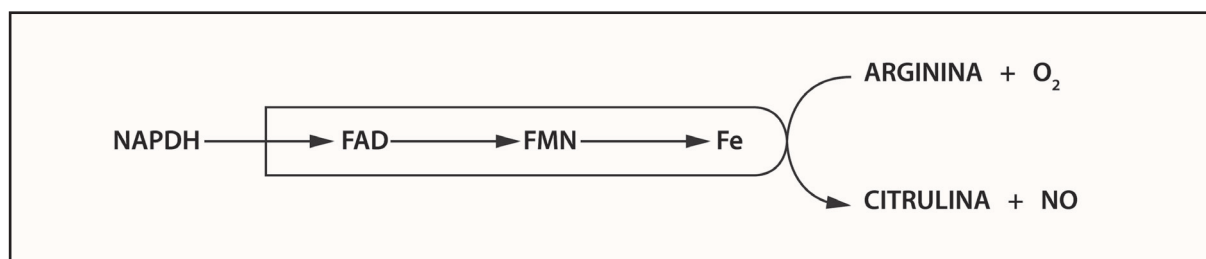
Nas células diabéticas, o aumento da concentração de glicose, acarreta o aumento da disponibilidade do piruvato. Com isso, pelo recebimento de mais substratos formam-se, no ciclo de Krebs, mais agentes redutores ($NADH$ e $FADH_2$). Essa maior disponibilidade de agentes redutores aumenta o gradiente da membrana mitocondrial, até alcançar um limiar crítico, e quando isso ocorre, há o bloqueio da transferência de elétrons no complexo III [Trumpower 1990], possibilitando dessa forma, que elétrons sejam doados ao oxigênio molecular para gerar o radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), principalmente pela coenzima Q. O radical superóxido é transformado pela enzima superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o qual é transformado a H_2O e O_2 por outras enzimas. Em organismos, que apresentam condições homeostáticas normais, operam dois sistemas, isto é, a geração de espécies reativas de oxigênio e a sua neutralização. Contudo, mesmo que a operação para eliminar as espécies reativas de oxigênio seja eficiente, sempre haverá espécies reativas de oxigênio livres, resultando num nível básico de modificação de biomoléculas em organismos não estressados [Lushchak 2014b]. As espécies reativas de oxigênio podem reagir com lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos modificando-os. A reação com lipídeos (peroxidação lipídica ou lipoperoxidação) pode ser detectada pela determinação do produto malonicodialdeído ou malondialdeído, usando como reagente o ácido tiobarbitúrico (TBA). Como a reação entre malondialdeído e ácido tiobarbitúrico não é específica, costuma-se expressar o resultado como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) [Lushchak

2014b]. Técnicas mais precisas empregam cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) ou métodos imunoquímicos [Claeson, Thorsen, Karsberg 2001]. A determinação de proteínas modificadas pelas espécies reativas de oxigênio é realizada com base na formação de grupos carbonílicos pela interação com 2,4 fenil hidrazina [Lenz, Costabel et al., 1989; Lushchak 2007]. Já a oxidação de ácidos nucleicos pode ser determinada pelos produtos, 8-hidroxiguanina [Lovell, Markesbery 2008], bem como pelo 8-oxo-7,8 dihidro-2-guanosina [Olinski, Siomek et al., 2007]. Os radicais livres, pelo fato de terem um elétron não pareado na última camada, podem reagir rapidamente, através de acoplamento radical-radical, que ocorre perto da taxa controlada pela difusão [Radi 2013]. Um exemplo desse tipo de interação é a formação do peroxinitrito, a partir do radical superóxido com o radical óxido nítrico.



O óxido nítrico é produzido biologicamente pela enzima óxido nítrico sintase (Figura 6.14). Foram identificados três isoformas de óxido nítrico sintase, uma predominantemente de tecido neural a nNOS (ou tipo I, ou NOS-1), uma enzima induzível, encontrada em vários tecidos a iNOS (ou tipo II ou NOS-2), e a terceira encontrada em tecido endothelial vascular, a eNOS (ou tipo III ou NOS-3) [Alderton, Cooper, Knowles 2001]. As enzimas, são dímeros funcionais e consistem em um domínio oxigenase, contendo heme e um domínio redutase contendo flavinas (FAD e FMN). Elétrons são transferidos de NADPH para o domínio redutase, por meio de FAD e FMN, os quais os transferem, ao ferro (Fe) do heme de outro monômero, onde está o oxigênio molecular. Os domínios são conectados por um sítio de reconhecimento da proteína calmodulina (CaM). A ligação da CaM aumenta a taxa de transferência de elétrons de NADPH para as flavinas do domínio redutase. [Gachhui, Presta et al., 1996] e iniciam a transferência de elétrons do domínio redutase para o centro heme [Abu-Soud, Yoho, Stuehr 1994].

Figura 6.14 - Esquemática da formação de óxido nítrico, pela transferência de elétrons a óxido nítrico sintase



O óxido nítrico é uma molécula relativamente estável, é um mensageiro intracelular abundante, que modula vários processos biológicos, tais como, pressão sanguínea, neurotransmissão, resposta imune e agregação de plaquetas [Ignarro 1990; Moncada, Palmer, Higgs 1991; Carballal, Bartsaghi, Radi 2014]. Tão logo o peroxinitrito se forma ele é protonado, isto é, recebe um próton (H⁺), transformando-se no ácido peroxinitroso. Em pH fisiológico ambas as espécies coexistem, (ONOO[·] + ONOOH) [Ferrer-Sueta, Campolo et al., 2018]. O termo peroxinitrito representa a soma do anion peroxinitrito (ONOO[·]) mais o ácido peroxinitroso (ONOOH). A protonação causa o enfraquecimento da ligação O-O no ácido peroxinitroso dando origem a uma clivagem homolítica, com formação de radical hidroxila (OH[·]) e dióxido de nitrogênio (NO₂) [Radi 2013]. A clivagem homolítica de uma ligação covalente, refere-se a clivagem, em que um elétron fica com um átomo, enquanto o outro elétron fica com o outro átomo. Na clivagem heterolítica, diferente da clivagem homolítica, o par de elétrons permanece com um dos átomos. O peroxinitrito ou o monóxido de nitrogênio pode se difundir

através de membranas fosfolipídicas possibilitando interação com outras moléculas [Maria, Lee, Groves 1997; Khairutdinov, Coddington, Hurst 2000; de Menezes, Augusto 2001]. Também, foi demonstrado, que nos eritrócitos o peroxinitrito pode circular através de canais de ânions [Denicola, Souza, Radi 1998; MacFadyen, Reiter et al., 1999]. A interação de compostos contendo heme (ferroprotoporfirina) com óxido nítrico e oxigênio leva a formação de heme-peroxinitrito [Sharma, Schaefer et al., 2017]. O peroxinitrito pode reagir com a glutatona formando o radical glutationil e com resíduo de tirosina formando o radical proteína-tirosil [de Menezes, Augusto 2001]. Assim, podemos considerar que os radicais livres são componentes da homeostase celular. Hoje, há uma tendência para considerar a existência da homeostase redox, isto é, um equilíbrio dinâmico entre os processos de oxidação e redução. A homeostase redox, que é a manutenção de uma inflexão nucleofílica, responde pelo estado fisiológico normal [Ursini, Maiorino, Forman 2016]. Sempre que houver desafios físicos, químicos ou biológicos haverá uma resposta, que move a homeostase celular em direção ao limite oxidativo do intervalo do estado estável [Medzhitov 2008], sendo oposto por uma reação feedback [Brigelius-Flohe, Flohe 2011], com a finalidade de restaurar a homeostase. A persistência do estímulo ou uma resposta feedback inadequada altera de forma permanente a homeostase. Enquanto a homeostase redox for mantida, pela sinalização para produção e eliminação de eletrofílicos e nucleofílicos [Forman, Davies, Ursini 2014], um estado patológico é gerado ou por desafio danoso permanente; ou, por uma resposta a injúria inadequada, ou ainda por um feedback nucleofílico ineficiente, levando ao deslocamento do estado redox [Ursini, Maiorino, Forman 2016]. Nucleofílicos são compostos ricos em elétrons, são carregados com carga negativa e contém pares de elétrons não compartilhados. Exemplos $R-SH$ (radical sulfidril) e $R-NH_2$ (grupo amino). Já os eletrofílicos são compostos deficientes em elétrons, podem ser carregados positivamente e contém uma camada de valência de elétrons não preenchida. Exemplos H^+ (próton) $R-C-R'$ (imina catiônica). Quando o equilíbrio, entre a produção de espécies reativas (de oxigênio e nitrogênio) e os níveis de antioxidantes, for adequado, sem que haja danos celulares, as funções fundamentais desempenhadas pelas células, como interação célula-célula e proliferação são realizadas por meio de modificações redox reversíveis de alvos localizados dentro de enzimas catalíticas ou sítios reguladores [Janssen-Heininger, Mossman et al., 2008; Vona, Gambardella et al., 2019].

Nas complicações de diabetes há um deslocamento da homeostase redox. No mecanismo unificante, proposto por Brownlee para explicar as complicações de diabetes, a etapa crítica na alteração do metabolismo normal é a inativação da enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [Brownlee 2005]. Essa enzima (GAPDH) é conhecida por catalisar a conversão do gliceraldeído-3-fosfato a ácido 1,3 bisfosfoglicérico no fluxo glicolítico, tendo como cofatores o NAD^+ e o fósforo inorgânico, com a produção de $NADH$ e ATP . Dessa forma, uma vez inativada, todas as reações anteriores da glicólise ficam praticamente bloqueadas, havendo acúmulo dos substratos, incluindo a glicose. Isso possibilita o estímulo das vias do poliol, hexosaminas, ativação do PKC e formação de AGEs. Tendo-se em vista que a sua concentração intracelular é alta [Mitsuzawa, Kimura et al., 2005], a GAPDH pode abranger sua diversidade funcional interagindo com diferentes proteínas, bem como com o DNA e RNA, realizando um número de funções necessárias para a fisiologia celular normal, estando envolvida no estresse oxidativo [Scheider, Knesting et al., 2018; Liang, Figtre et al., 2015] e no estresse proteotóxico [Delpont, Kins, Hewer 2020].

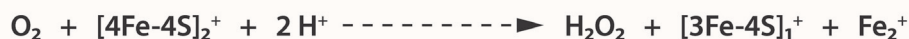
Autofagia é um processo metabólico, que envolve degradação pelos lisossomos, visando reciclar os componentes celulares e organelas danificadas em resposta a diversas condições de estresse, tais como privação de nutrientes, infecção viral e estresse genotóxico. Evidências justificam o estresse oxidativo como ponto de convergência desses estímulos com as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio entre os principais transdutores do sinal celular sustentando a autofagia [Filomeni, De Zio, Cecconi 2015].

Modificações enzimáticas de proteínas pós-tradução, como já vimos anteriormente, são modificações químicas, que ocorrem em um ou mais resíduos de aminoácidos de uma proteína após sua síntese pelo ribossomo. Essas modificações enzimáticas podem ser reversíveis ou irreversíveis e alteram a estrutura, a estabilidade e as funções de proteínas nas células. Glicolisação, fosforilação, ubiquitinação, acetilação são alguns exemplos desse tipo de modificação. Por outro lado, as proteínas podem sofrer modificações pós-tradução sem o envolvimento de enzimas, isto é, são reações químicas mediadas por compostos reativos sobre as proteínas, eventos que são associados a danos celulares [Thorpe, Baynes 2003; Golubev, Hanson, Gladyshev 2017]. A glicação de proteínas, como já vimos, é um bom exemplo. No diabetes há um acúmulo da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima citossólica, dentro de núcleo celular. No núcleo a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase exerce vários papéis como na transcrição gênica, na replicação e reparação de DNA e na exportação de RNA nuclear [Morgenegg, Winkler et al., 1986; Singh, Green 1993; Zheng, Roeder, Luo 2003]. A translocação induzida e o acúmulo de GAPDH nuclear foram associados a formação do estresse oxidativo e produção de estímulos pró-inflamatórios como óxido nítrico e citocinas [Sirover 1999; Kanwar, Kowluru 2009; Yego, Vincent et al., 2009; Hara, Snyder 2006]. O mecanismo para explicar a movimentação da enzima GAPDH do citossol para o núcleo tem sido foco da atenção de pesquisadores. No núcleo há evidências do envolvimento na morte celular, isto é, a apoptose [Chuang, Hough, Senatorov 2005; Sirover 1999]. A GAPDH por si só não consegue entrar no núcleo, pois falta-lhe o sinal de localização nuclear, então vem a pergunta: como a GAPDH entra no núcleo? A proteína E3 ubiquitina ligase Siah-1 (Seven In Absentia Homolog-1), foi identificada como transportadora de GAPDH para dentro do núcleo. [Hara, Agrawal et al., 2005]. Proteínas SIAH-1 são homólogos humanos da proteína E3 ubiquitina ligase suína (Seven In Absentia) da *Drosophila* [Neman, Linarez-Cruz et al., 1996] tendo um papel na apoptose, e supressão de tumor. A sequência dos eventos moleculares responsáveis pela translocação nuclear de GAPDH durante a morte celular pode ser descrita resumidamente, segundo Hara e cols, como se segue: 1- um resíduo de cisteína presente no sítio ativo (catalítico) da enzima GAPDH sofre nitrosilação pelo óxido nítrico (NO), o qual é gerado pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ou pelo óxido nítrico sintase endotelial (eNOS); 2- a nitrosilação do resíduo de cisteína confere à enzima GAPDH a capacidade de se ligar a proteína Siah-1, uma E3 ubiquitina ligase formando um complexo estável GAPDH-Siah-1, e 3- com o aumento da ligação GAPDH-Siah pela nitrosilação de GAPDH, o complexo formado pode se deslocar ao núcleo mediado pelo sinal de localização nuclear de Siah-1. A GAPDH estabiliza a Siah-1 facilitando sua degradação de proteínas nucleares [Hara, Cascio, Sawa 2006]. Assim a GAPDH no núcleo contribui para a morte celular, principalmente induzindo ações citotóxicas de Siah-1. Um dos mecanismos propostos para explicar a inativação de GAPDH é o processo de ribosilação. O aumento da concentração intracelular de glicose provoca o aumento da produção de agentes redutores (NADH e FADH₂). Com isso há maior disponibilidade desses agentes redutores para o ciclo de Krebs e por conseguinte aumentando a produção de radicais livres. Estes, induzem dano ao DNA pela ruptura de uma corda, provocando a ativação da enzima reparadora poli-(ADP-Ribose) polimerase (PARP). Uma vez ativada essa enzima (PARP) causa a ribosilação de GAPDH [Du, Matsumura et al., 2003; Devaraja-Narashimha, Padanilan 2009]. A poli-ADP-ribosilação induzida pela ativação da PARP, inibe também a atividade da fosfofrutoquinase -1 (PFK-1) no cérebro e da GAPDH em células endoteliais [Gagne, Isabelle et al., 2008; Du, Matsumura et al., 2003]. Outra enzima glicolítica que é inibida pela PARP, nos neurônios é a hexoquinase, que possui um fragmento que liga a poli-ADP-ribose [Andrabi, Umanah et al., 2014]. Gagne, Isabelle et al., 2008].

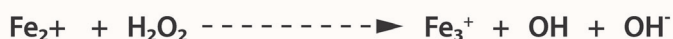
Por outro lado, há evidências de que a translocação nuclear de GAPDH, também é mediada por acetilação. Contudo, isso só ocorre quando três resíduos de lisina da enzima forem acetilados, numa reação catalisada pela acetil transferase [Ventura, Mateo et al., 2010]. A acetil transferase é uma enzima que transfere grupos acetilas de acetilSCoA (acetil-coenzima A) para

um grupo aceptor que neste caso é o resíduo lisina presente no GAPDH. Outra modificação de proteínas pós tradução é o processo de succinação. O grupo sulfidril (-SH) da cisteína é alvo de compostos reativos. A reação irreversível não enzimática entre o fumarato e o grupo sulfidril de proteínas gera uma ligação tio-éter, e o processo é chamado de succinação para diferenciá-lo da reação enzimática chamada succinilação [Alderson, Wang et al., 2006]. A presença do aduto succino-cisteína, que está presente no diabetes foi proposto como um biomarcador do estresse mitocondrial e oxidativo [Thomas, Storey et al., 2012]. Esse aduto proveniente de um intermediário metabólico do ciclo de Krebs, identifica o fumarato como um eletrofílico endógeno, com potencial na regulação do metabolismo celular [Jove, Pradas et al., 2020].

Outro aspecto a ser considerado é o aumento da produção mitocondrial do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que vai inativar a enzima aconitase, através da ruptura do grupo (ferro-enxofre) [Gardner, Raineri et al., 1995; Liochev, Fridovich 1994; Radi 2018]. A aconitase é uma enzima do ciclo de Krebs que catalisa a conversão do citrato a isocitrato. É uma proteína que contém quatro átomos de ferro, que não faz parte de heme, complexados a quatro enxofres inorgânicos e três enxofres de cisteína. Um átomo de ferro fica disponível para ligar citrato e depois o isocitrato, através e seus grupos carboxílicos e hidroxilas. Esse ferro facilita as reações de desidratação e reidratação na transformação de citrato a isocitrato, passando pelo intermediário cis-aconitato. Os grupos (ferro-enxofre) são grupos prostéticos encontrados em proteínas responsáveis por funções, que incluem transferência de elétrons, regulação da expressão gênica e ligação a substrato e ativação. O grupo (4Fe-4 S) é essencial para o funcionamento de muitas proteínas, de modo que a disfunção na síntese do grupo (4Fe-4S) leva a doença [Wachinowsky, Hendricks et al., 2019].



A reação do superóxido mitocondrial com o grupo [4Fe-4S] da aconitase, além de interferir no ciclo de Krebs, também libera Fe_2^+ o qual fica disponível para reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzindo $^{\cdot}OH$ e $OH^{\cdot-}$, pela reação semelhante a de Fenton:



O potencial danoso do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inclui modificações de proteínas, lipídeos e DNA, por mecanismos de nitração, carbonilação, peroxidação e nitrosilação. Consequentemente, o estresse oxidativo interfere na função e sobrevivência das células beta pancreáticas, através de vários mecanismos, que inclui alterações de atividades enzimáticas, transporte via canais iônicos, a transdução de sinais via receptor, desregulação da expressão gênica e apoptose [Keane, Cruzat et al., 2015; Newsholme, Cruzat et al., 2016; Gerber, Rutter 2017]. Tudo que foi visto até agora, sugere que a homeostase redox representa uma característica relacionada diretamente ao equilíbrio do metabolismo. Isso também, sugere que o estresse oxidativo desempenha um papel chave na patogênese do diabetes e suas complicações.

HIPOGLICEMIA

O controle da concentração de glicose no sangue é crucial para a sobrevivência. Variações da concentração de glicose no sangue refletem alterações do metabolismo, seja pela hiperglicemia ou hipoglicemia. Se de um lado, a hiperglicemia crônica constitui uma condição danosa para alguns órgãos, do outro lado a hipoglicemia é uma condição de risco para o paciente.

A hipoglicemia é comumente causada por medicações (insulina, e outros agentes hipoglicemiantes) em pacientes diabéticos. Quando isso ocorre, repostas contrarreguladoras são montadas, que atuam de forma coletiva para que o nível de glicose sanguíneo retorne ao normal. Dentre essas respostas contrarreguladoras podemos citar, a descarga do sistema nervoso e a secreção de hormônios contrarreguladoras (epinefrina ou adrenalina, norepinefrina ou noradrenalina, hormônio do crescimento, cortisol e glucagon) [Seaquist, Anderson et al., 2013]. As respostas contrarreguladoras aumentam o nível de glicose do sangue, estimulando a produção hepática de glicose e reduzindo a secreção de insulina e a sensibilidade tecidual à insulina [Dungan, Braithwaite, Preiser 2009; Krinsley 2003].

Uma força tarefa formada por especialistas da *American Diabetes Association e Endocrine Society* definem a hipoglicemia iatrogênica em pacientes diabéticos como todo o episódio de uma concentração de glicose plasmática anormalmente baixa, que expõe o indivíduo a potenciais danos [Seaquist, Anderson et al., 2013]. Essa força tarefa sugeriu a seguinte classificação da hipoglicemia no diabetes: (1) Hipoglicemia Severa, é um evento que requer a assistência de outra pessoa para administrar ativamente carboidratos, glucagon ou outras ações corretivas. A concentração plasmática de glicose pode não estar disponível durante o evento, porém a recuperação neurológica após o retorno da glicose plasmática ao nível normal é considerada evidência de que o evento foi induzido por baixa concentração plasmática de glicose; (2) Hipoglicemia Sintomática Documentada, é um evento durante o qual os sintomas típicos de hipoglicemia são acompanhados pela medida da concentração de glicose plasmática ≤ 70 mg/dL ($\leq 3,9$ mmol/L); (3) Hipoglicemia Assintomática, é um evento não acompanhado pelos sintomas típicos de hipoglicemia, porém com uma medida da glicemia ≤ 70 mg/dL ($\leq 3,9$ mmol/L); (4) Hipoglicemia Sintomática Provável, é um evento durante o qual os sintomas típicos de hipoglicemia não são acompanhados pela determinação da concentração de glicose do sangue, porém que presumivelmente foi causado por concentração plasmática de glicose ≤ 70 mg/dL ($\leq 3,9$ mmol/L) e (5) Pseudo-Hipoglicemia, é um evento durante o qual as pessoas diabéticas relatam qualquer sintoma típico de hipoglicemia com a medida da concentração plasmática de glicose > 70 mg/dL ($> 3,9$ mmol/L).

A hipoglicemia recorrente reduz o nível de glicose que precipita as respostas contrarreguladoras necessárias para restaurar a euglicemia durante um episódio subsequente de hipoglicemia [Dagogo-Jack, Craft, Cryer 1993; Davis, Shavers et al., 1997; Heller, Cryer 1991]. Como resultado, os pacientes, com frequente hipoglicemia não tem a experiência dos sintomas da resposta adrenérgica para abaixar a glicose, até que a glicose alcance valores bem baixos [Seaquist, Anderson et al., 2013]. Neste ponto surge o questionamento: o que é limiar glicêmico para a hipoglicemia? Entendemos que o limiar glicêmico para a hipoglicemia representa a menor concentração de glicose sanguíneo capaz de ativar as respostas contrarreguladoras. O limiar glicêmico para indivíduos normais foi primeiramente estabelecido em que várias respostas contrarreguladoras são detectadas [Cryer 1985; Amiel, Tamborlane et al., 1988]. O limiar glicêmico para indivíduos normais varia de 51 mg/dL (2,8 mmol/L) a 61 mg/dL (3,4 mmol/L), dependendo das respostas específicas medidas [Cryer 1985]. Já para os indivíduos diabéticos (tipo 1 e 2) há um aumento de 40 % no limiar glicêmico [Spyer, Hattersley et al., 2000; Chakera, Hurst et al 2018]. A interpretação desses achados levou a sugestão de que a manutenção da hiperglicemia

aumenta o limiar glicêmico, capaz de detectar e reagir a hipoglicemia, um fenômeno denominado de hipoglicemia relativa. Portanto, entendemos como hipoglicemia relativa, o aumento que ocorre no limiar glicêmico responsável pela detecção e ativação das respostas contrarreguladoras. Dois modelos são considerados para detectar a hipoglicemia.

Modelo Cérebro-Glicose Sensitivo

A teoria deste modelo postula que a sensibilidade cérebro-glicose é medido por neurônios especializados, responsivos a glicose, localizados no parênquima cerebral, que detecta a hipoglicemia quando o nível de glicose do fluido intersticial do cérebro, que circunda esses nervos cai abaixo do limiar crítico. Em suporte a esse modelo, evidências mostram que os neurônios sensitivos a glicose, se concentram em áreas do cérebro envolvidos na homeostase da glicose, cuja atividade é sensível a alterações locais de glicose [Schwartz, Krinsley et al., 2023; Kang, Dunn-Meynell et al., 2006; Thores 2012].

Modelo Sangue-Glicose Sensitivo

Este modelo propõe, que o nível de glicose circulante é detectada pelos neurônios sensoriais, que inervam os vasos sanguíneos e essa informação é transportada aos centros glucorreguladores no cérebro. De acordo com essa teoria, as respostas contrarreguladoras são montadas quando o nível de glicose da corrente sanguínea (e não o cérebro) cai a um nível incompatível com o próprio funcionamento do cérebro. Brown, Scarlett, Schwartz 2019; Bentsen, Mirzadeh, Schwartz 2019]. Portanto as evidências apontam para que o pâncreas endócrino é parte de um grande sistema regulador cuja atividade é integrada com outros sistemas de controle homeostático crítico [Brown, Scarlett, Schwartz 2019].

METABOLÔMICA, PROTEÔMICA E DIABETES

Através de estudos de metabolômica e proteômica, os pesquisadores começaram a explorar uma possível relação entre intermediários do metabolismo e diabetes ou risco de diabetes. Entendemos por metabolômica uma análise sistemática e estudo de metabolitos numa amostra biológica, incluindo compostos bioquímicos de baixo peso molecular, tais como ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos, lipídeos e nucleotídeos [Roberts, Koulman, Griffin 2014; Guasch-Ferre, Hrury et al., 2016]. Da mesma forma, a análise proteômica tem por objetivo a quantificação e caracterização de proteínas que participam em processos biológicos no organismo.

METABOLÔMICA

Os dados obtidos numa investigação científica devem ser confiáveis e somente serão de utilidade quando as técnicas são conhecidas de uma forma precisa. Para isso, a qualidade da amostra se faz importante para a exatidão das medidas dos analitos (uma substância química que está sendo quantificada e estudada). Isso proporciona ao pesquisador confiar nos dados obtidos. Quaisquer dúvidas que possam ser dirimidas devem ser usados repetições usando as mesmas condições.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é muito usada para revelar a estrutura atômica de macromoléculas em solução, Ela se baseia no comportamento do núcleo atômico,

quando expostos a fortes campos magnéticos, levando em consideração os átomos vizinhos e a frequência da radiação, sendo uma metodologia não destrutiva [Moka, Vorreuther et al., 1998].

A espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa ou líquida é também muito usado no estudo da relação metabólitos e diabetes. A espectrometria de massa usa a separação cromatográfica, a ionização do analito e a separação iônica para identificar e quantificar compostos de amostras biológicas com alta resolução e sensibilidade. A associação positiva entre metabólitos e diabetes foi evidenciada por pesquisas, que mostraram o envolvimento de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), bem como de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) com diabetes e resistência à insulina [Wang, Larson et al., 2011; Newgard, An et al., 2009; Wurtz, Soininen et al., 2013]. As proteínas são moléculas formadas a partir de aminoácidos dos quais 9 são conhecidos como aminoácidos essenciais. Essenciais porque esses aminoácidos não são sintetizados no organismo, de modo que devem ser adquiridos do exterior. Desses aminoácidos essenciais três são ditos de cadeia ramificada, devido ao fato de sua cadeia lateral não ser alifática. Da mesma forma que esses aminoácidos de cadeia ramificada, também, os aromáticos (fenilalanina e tirosina) tem implicações com diabetes. A fenilalanina é também um aminoácido essencial, enquanto a tirosina não pois, a hidroxilação da fenilalanina produz tirosina.

Os achados de que os aminoácidos de cadeia ramificada presentes no sangue tem alto risco de desenvolvimento de diabetes foram confirmados por várias publicações [Newgard, An et al., 2009; Waldorf, Ma et al., 2016; Floegel, Stefan et al., 2013]. Os altos níveis de aminoácidos de cadeia ramificada circulante se devem a reduzida taxa de oxidação pelos tecidos adiposos, devido a coordenada supressão transcricional das enzimas catabólicas, bem como pela aumentada fosforilação e inativação do complexo desidrogenase cetoácido de cadeia ramificada no fígado [White, Newgard 2019]. Outros metabólitos que estão sendo pesquisados são a glutamina e glutamato. A glutamina está envolvida na regulação da secreção de insulina e da função das células beta do pâncreas, enquanto o glutamato promove a gliconeogênese e a liberação de glucagon [Liu, Zheng et al., 2019; Fahien, McDonald 2011].

Em relação aos lipídeos, os saturados de pequeno número de átomos de carbono, tais com o mirístico (C14), palmítico (C16) e esteárico (C18) tendem a apresentar níveis maiores em indivíduos diabéticos do tipo 1, comparados a indivíduos não portadores de diabetes [Kaur, Rizk et al., 2013; Zhang, Yan et al., 2014]. Evidências apontam para o envolvimento de lisofosfatidil etanolamina e lisofosfatidil colina no diabetes, baseado em aumentos de suas concentrações em indivíduos portadores da doença comparados aos não diabéticos [Han, Xia et al., 2011].

A pergunta que se faz é: qual o mecanismo de atuação desses metabólitos na resistência a insulina e no diabetes? Futuras pesquisas devem desvendar o mecanismo.

PROTEÔMICA

Os estudos da relação entre proteínas e diabetes passa por métodos de afinidade, que são empregados nos experimentos. A metodologia de afinidade se baseia na afinidade de anticorpos e proteínas, que se deseja estudar, isto é, anticorpos que ligam substâncias capazes de serem detectadas como luminescência, fluorescência, radioatividade e atividade enzimática. Estas técnicas foram utilizadas para desvendar as associações dos níveis de adiponectina, leptina, proteína ligadora de vitamina E, a afmina [Spranger, Kroke et al., 2003; Sun, van Dam et al., 2010; Kolleritis, Lamina et al., 2017]. Evidências apontam que as ilhotas de Langerhans expostas a interleucina-1 beta (IL-1 β) por 24 horas, mostravam alterações na expressão de 82 proteínas envolvidas em: (a) transdução de energia e potencial redox; (b) glicólise e ciclo de Krebs; (c) síntese de DNA, RNA, proteínas chaperones (proteínas que supervisionam determinados

processos), e dobramento de proteínas; (d) transdução de sinal, regulação, diferenciação e apoptose e (e) defesa celular. [Cristensen, Larsen et al., 2000; Sparre, Cristensen et al., 2002]. A interleucina-1 β (IL-1 β) é um polipeptídeo pertencente a família das citocinas, as quais atuam como reguladores do crescimento e diferenciação. A IL-1 β é a principal citocina próinflamatória, cujos níveis circulantes são bem regulados para que haja a prevenção das vias aberrantes ativas, que podem levar a processos inflamatórios crônicos. Os autores do trabalho, sugerem que a IL-1 β se encontra nas ilhotas de Langerhans, no período pré-diabético, podendo então participarem na iniciação de diabetes.

MICRO-RNA E DIABETES

Micro-RNAs constituem uma família de pequenos polinucleotídeos, com um comprimento de cerca de 21 nucleotídeos, não codificantes, capazes de regular a expressão gênica, a nível de transcrição, ou modulando diretamente a expressão gênica ou indiretamente degradando o RNA mensageiro (mRNA) [Filipowics, Bhattacharyya, Sonenberg 2008; Bartel 2009]. Localizados em unidades de transcrição, os miRNAs (mi-R) podem ser classificados em três categorias, a saber: miR intrônico, localizado na unidade de transcrição codificante; miR intrônico, localizado na unidade de transcrição não codificante e miR exônico, localizado na unidade de transcrição não codificante [Kim, Nam 2006; Rodriguez, Griffiths-Jones et al., 2004]. Estudos funcionais revelaram que microRNAs desempenham um importante papel em muitas funções biológicas, tais como tempo de desenvolvimento, diferenciação celular, metabolismo, organogênese e apoptose [Há, Kim 2014], bem como na comunicação intercelular [Turchinovich, Tonevitsky, Burwinkel 2016]. Essa ação de microRNAs na comunicação entre as células é realizada através de canais formados na junção entre as duas membranas. Os microRNAs maduros podem ser transferidos através dos canais tendo como alvo o RNA mensageiro (mRNA) [Saliminejad, Khorshid et al., 2019].

O primeiro microRNA identificado nas ilhotas de Langerhans, foi o microRNA-375. A super expressão de microRNA-375 suprime a secreção de insulina, enquanto a inibição do microRNA-375 endógeno intensifica a secreção de insulina [Poy, Eliasson et al., 2004]. Com relação ao diabetes e suas complicações, vários microRNAs como miR-29a, miR-29b1 e miR-29b2 [Rupaimoole, Slack 2017].

Durante a patogênese do diabetes do tipo 1, as células imunes ativadas se infiltram de forma progressiva no pâncreas, invadindo as células beta, um fenômeno chamado insuliti (inflamação das ilhotas). Durante esse fenômeno, as células imunes e as células beta trocam citocinas pró-inflamatórias, resultando em morte celular [Eizirik, Colli, Ortis 2009; Guay, Roggli et al., 2015]. Esse ambiente inflamatório tem um impacto nocivo sobre as funções das células beta, resultando na redução da síntese de insulina e perda de células beta. Muito embora, estudos sobre o mecanismo que marca alterações na expressão gênica, desencadeada por citocinas tem focalizado os fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear kapa (NFkB), os microRNAs como omiR-124^a, miR-375, miR-9, miR 29 e outros parecem, também desempenhar um papel importante no controle das funções das células beta [Baroukh, Ravier et al., 2007; El-Ouaamari, Baroukh et al., 2008; Maisance, Abderrahmani et al., 2006].

No diabetes do tipo 2 a família de microRNAs 200 regula a sobrevivência das células beta pancreáticas. A miR-200 quando induzida de forma significativa nas ilhotas de camundongos diabéticos resulta em apoptose das células beta e consequente redução da produção de insulina [Belgardt, Ahmed et al., 2015].

BIBLIOGRAFIA GERAL

Devlin TM 2011. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. Seventh Edition. John Wiley & Sons Inc. USA.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L 2002 Biochemistry. Fifth Edition W.H. Freeman and Company, New York.

Voet D, Voet JG 1995 Biochemistry. Second Edition. John Willey & Sons, Inc. New York.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Abordo EA, Thornalley PJ 1997. Synthesis and secretion of tumor necrosis factor alpha by human monocytic THP-1 cells and chemotaxis induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose derived advanced glycation end products. *Immunol Lett* 58: 139-47.

Abu-Soud HM, Yoho LL, Stuehr DJ 1994. Calmodulin controls nitric oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra and interdomain electron transfer. *J Biol Chem* 269: 32047-50.
Ahmed N 2005. Advanced glycation end products. Role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 67: 3-21.

Ahmed N, Dobler D, Dean M, Thornalley PJ 2005. Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J Biol Chem* 280: 5724- 32.

Ahmed N, Thornalley PJ 2007. Advanced glycation end products: what is their relevance to diabetic complications. *Diabetes Obse Metab* 9: 233-45.

Aldebasi Y, El-Gendy SM, Kamel A, Mohieldein A 2013. Aldo-keto reductase and sorbitol dehydrogenases in Egyptian diabetic patients with and without proliferative retinopathy. *Clin Exp Optom* 96: 303-9.

Alderson NL, Wang Y, Blatnik M et al., 2006. S-(2-succinyl) cysteine: a novel chemical modification of tissue proteins by Krebs cycle intermediate. *Arch Biochem Biophys* 450:1-8.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles G 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615.

Amiel SA, Tamborlane WV, Sacca L, Sherwin RS 1988. Hypoglycemia and glucose counterregulation in normal and insulin dependent diabetic subjects. *Diabetes Metab Rev* 4: 71-89.

Andrabi SA, Umanah GK, Chang C et al., 2014. Poly-ribose polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proc Nat Acad Sci USA* 111: 10209-14.

Antal CE, Violin JD, Kunkel MT, et al., 2014. Intramolecular conformational changes optimize protein kinase signaling. *Chem Biol* 21: 459-69.

Attisano L, Wrana JL 2002. Signal transduction by the TGF beta binding protein-1. *J Cell Biol* 165: 723-34.

- Baroukh N, Ravier MA, Lode MK et al., MicroRNA -124a regulates Foxa-2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta cell line. *J Biol Chem* 282: 19575-88.
- Bartel DP 2009. Micro RNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 214-33.
- Baynes JW, Thorpe SR, Murtiashaw MH 1984. No-enzymatic glucosylation of lysine residues in albumin. *Methods Enzymol* 106:88-98.
- Baynes JW 2002. The Maillard hypothesis on aging. Time to focus on DNA. *Ann NY Acad Sci* 959: 360-7.
- Belgardt BF, Ahmed K, Sprange M et al., 2015. The microRNA 200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nature Med* 21: 619-27.
- Bentsen MA, Mirzadeh Z, Schwartz MW 2019. Revisiting how the brain senses glucose and why. *Cell Metab* 29: 11-7.
- Berger DH 2002. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg* 26: 767-71.
- Berkenpas MB, Lawrence DA, Ginsburg D 1995. Molecular evolution of plasminogen activator inhibitor-1 functional stability. *EMBO J* 14: 2969-77.
- Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP 1998. Age and their interactions with AGE receptors in vascular disease and diabetes. I The AGE concept. *Cardiovasc Res* 37: 586-600.
- Bookchin RM, Gallop PM, 1968. Structure of hemoglobin A1c; nature of the N-terminal β chain blocking group. *Biochem Biophys Res Commun* 22: 131-40.
- Border WA, Noble NA 1994. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286-92.
- Bornancin F, Parker PJ 1997. Phosphorylation of protein kinase C α on serine 657 controls the accumulation of the active enzyme and contributes to its phosphatase resistant state. *J Biol Chem* 272: 3544-9.
- Brigelius-Flohe R, Flohe I 2011. Basic principles and emerging concepts in redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal* 15: 2335-81.
- Brings S, Fleming T, Freichel M, Muckenthaler MU, Herzig 77 Nawroth PP 2017. Dicarbonyls and advanced glycation end products in the development of diabetic complications and target for intervention. *Int J Mol Sci* 18; 884, doi: 10.3390/ijms 18050984.
- Brown JM, Scarlett JM, Schwartz MW 2019. Rethinking the role of the brain in glucose homeostasis and diabetes pathogenesis. *J Clin Invest* 129: 3035-7
- Brownlee M 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-20.
- Brownlee M 2005. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-25.

Bucala R Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H 1993. Lipid advanced glycosylation. Pathways for lipid oxidation in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA* 90: 6434-8.

Buday L, Tompa P 2010. Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J* 277: 4348-55.

Buse MG 2006. Hexosamines, insulin resistance and the complications of diabetes; current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E 1-8.

Carballal S, Bartesaghi S, Radi R 2014. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1840; doi 10.1016/j.bbagen.2013.07.005.

Cenni V, Doppler H, Sonnenberg ED et al., 2002. Regulation of novel protein kinase epsilon by phosphorylation. *Biochem J* 363: 537-45.

Cerami C, Founds H, Nicholl I et al., 1997. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13915-20.

Chakera AJ, Hurst PS, Spyer G et al., 2018. Molecular reductions in glucokinase activity increase counterregulation responses to hypoglycemia in mice and humans with diabetes. *Mol Metab* 17: 17-27.

Chambom P et al., 1963. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 11: 39-43.

Chandra D, Jackson EB, Ramana KV et al., 2002. Nitric oxide prevents aldose reductase activation and sorbitol accumulation during diabetes. *Diabetes* 51: 3095-101.

Charonis AS, Reger LA, Dege TE et al., 1990. Laminin alteration after in vitro non enzymatic glycosylation. *Diabetes* 39: 807-14.

Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW 1998. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273: 8225-31.

Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A 2013. AGEs rather than hyperglycemia are responsible for microvascular complications in diabetes. A “glycoxidation –centric”point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23: 913-9.

Chuang DM, Hough C, Senatorov VV 2005. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis and neurodegenerative disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 269-90.

Claeson K, Thorsen G, Karlberg B 2001. Methyl malondialdehyde as an internal standard for the determination of malondialdehyde. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 751: 315-23.

Commoner B, Townsend J, Pake GE 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* 174: 689-91.

Coussens L, Parker PJ, Rhee L et al., 1986. Multiple distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233: 859-55.

Craven PA, Davidson CM, De Rubertis FR 1990. Increase diacylglycerol mass isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes* 39: 667-74.

Cryer PE 1985. Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 313: 232-41.

Dagogo-Jack, Craft S, Cryer PE 1993. Hypoglycemia-associated autonomic failure in insulin-dependent diabetes mellitus. Recent antecedent hypoglycemia reduces autonomic responses to symptoms of, and defense against subsequent hypoglycemia. *J Clin Invest* 91: 819-28.

Davis SN, Shavers C, Mosqueda-Garcia R, Costa F 1997. Effects of differing antecedent hypoglycemia on subsequent counterregulation in normal humans. *Diabetes* 46: 1328-35.

De Menezes SL, Augusto O 2001. EPR detection of glutathionyl and protein tyrosyl during the interaction of peroxy-nitrite with macrophages. *J Biol Chem* 276: 39879-84.

Delpont A, Kins S, Hewer R 2020. The amyloid precursor protein affects glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase levels, organelle localization and thermal stability. *Mol Biol Rep* 47: 3019-24.

Denicola A, Souza JM, Radi R 1998. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3566-71.

Derynk R, Jarret JA, Chen EY et al., 1985. Human transforming growth factor beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701-5.

Devaraja-Narashimha K, Padanilan B 2009. PARP-1 inhibits glycolysis in ischemic kidney. *J Am Soc Nephrol* 20: 95-103.

Doi T, Vlassara H, Kirstein M et al., 1992. Receptor specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet derived growth factor. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 2873-7.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L et al., 2000. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp-1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12222-6.

Du X, Matsumura T, Edelstein D et al., 2003. Inhibition of GAPDH activity by poly-(ADP-Ribose)-polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 112: 1049-57.

Dungan KM, Braithwaite SS, Preiser JC 2009. Stress hyperglycemia. *Lancet* 373: 1798-807.

Duquesnes N, Lezovalch F, Crozatier B 2011. PKC delta and PKC epsilon. Foes of the same or strangers. *J Mol Cell Cardiol* 51: 665-73.

Dynan WS 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in SV40 early promoter. *Cell* 35: 79-87.

Eizirik DL, Colli ML, Ortis F 2009. The role of inflammation in insulinitis and beta cell loss in type 1 diabetes. *Nature Rev Endocrinol* 5: 219-26.

- El-Ouamaari A, Baroukh N, Marten GA et al., 2008. MiR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose induced biological responses in pancreatic beta cells. *Diabetes* 57: 2708-17.
- Exner R, Wessner B, Manhart N, Roth E 2000. Therapeutic potential of glutathione. *Wien Lin Wochenschr* 112: 610-6.
- Expert Committee on the Classification of Diabetes 2003. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 (Supl 1): S5-20.
- Fahien LA, McDonald MJ 2011. The complex mechanism of glutamate dehydrogenase in insulin secretion. *Diabetes* 60: 2450-4.
- Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M et al., 2018. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem Rev* 118: 1338-408.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N 2008. Mechanism of post-transcriptional regulation of micro RNAs: are the answers in sight? *Nature Rev Genet* 9: 102-14.
- Filomeni G, De Zio D, Cecconi F 2015. Oxidative stress and autophagy: clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 22: 377-88.
- Floegel A, Stefan N, Yu Z et al., 2013. Identification of serum metabolites associated with the risk of type 2 diabetes using target metabolomic approach. *Diabetes* 62: 639-48.
- Forman HJ, Davies KJ, Ursini F 2014. How do nutritional antioxidant really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Rad Biol Med* 66: 24-35.
- Fritz G 2011. Rage: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci* 36: 625-32.
- Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR et al., 1998. Role of Maillard reaction in aging of tissue proteins. *J Biol Chem* 273: 18714-9.
- Gabbay KH 1973. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *New Engl J Med* 288: 831-6.
- Gachhui R, Presta A, Bentley DF et al., 1996. Characterization of the reductase domain of rat neuronal of nitric oxide synthase generated in methylotrophic yeast *Picchia pastoris*. Calmodulin response is complete within the reductase domain itself. *J Biol Chem* 271: 20594-602.
- Gagne JP, Isabelle M, Lok S et al., 2008. Proteome-wide identification of poly (ADP-ribose) binding proteins and poly ADP-ribose associated protein complexes. *Nucleic Acid Res* 36: 6959-76.
- Gallet X, Charlotiaux B, Thomas A, Brasseur R 2000. A fast method to predict interaction sites from sequences. *J Mol Biol* 302:917-26.
- Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW 1995. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 270: 5839-48.

Geraldes P, king GL 2010. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circul Res* 106: 1319-31.

Gerber PA, Rutter GA 2017. The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 26: 501-18.

Gerschman P, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 62362-6.

Gerich JE 1993. Control of glycaemia. *Bailliere`s Clin Endocrinol Metab* 7: 551-86.

Gerich JE, Woerle HJ, Meyer C, Stumvoll M 2001. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 24: 382-91.

Giogi C, Agnoletto C, Baldini C, et al., 2010. Redox control of protein kinase C: cell and disease specific aspects. *Antioxid Redox Signal* 13: 1051-85.

Goldberg T, Cai W, Peppas M et al., 2004. Advanced glycoxidation end products commonly consumed foods. *J Am Dietetic Ass* 104: 1287-91.

Golubev A, Hanson AD, Gladyshev VN 2017. Non enzymatic molecular damage as a prototypic diver aging. *J Biol Chem* 292: 6028-38.

Gould CM, Kannan N, Taylor SS, Newton AC 2009. The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the terminal tail. *J Biol Chem* 284: 4921-35.

Graybill C, Wee B, Atwood SX, Prehoda KE 2012. Partitioning defective protein 6 (part 6) by pseudo substrate displacement. *J Biol Chem* 287: 21003-11.

Griffith OW 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med* 27: 922-35.

Guasch-Ferre LD, Koulman A, Griffin JL 2014. Metabolomics in pre-diabetes and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 39: 833-46.

Guay C, Roggli E, Nesca V et al., 2015. Diabetes mellitus a microRNA related disease? *Transl Res* 157: 253-64.

Ha M, Kim VN 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 15: 509-24.

Halliwell B, Gutteridge JMC 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Press.

Halliwell B, Gutteridge JMC 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press.

Han LD, Xia JF, Liang QL et al., 2011. Plasma esterified and non esterified fatty acids metabolic profiling using gas chromatography, mass spectrometry and its application in the study of diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Anal Chim Acta* 689: 85-91.

- Hara MR, Snyder SH 2006. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cell Mol Neurobiol* 26: 527-38.
- Hara MR, Cascio MB, Sawa A 2006. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim Biophys Acta* 1762: 502-9.
- Hara MR, Agrawal N Kim SE et al., 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah-1 binding. *Nat Cell Biol* 7: 665-74.
- Harding JJ, Blaktny R, Ganea E 1996. Glutathione in disease. *Biochem Soc Trans* 24: 881-4.
- Heilig CW, Concepcion LA, Riser SL et al., 1995. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest* 96: 1802-14.
- Heller SR, Cryer PE 1991. Reduced neuroendocrine and symptomatic responses to subsequent hypoglycemia after 1 episode of hypoglycemia in non diabetic humans. 40: 223-6.
- Ho CH, Jap TS 1993. Relationship of plasminogen activator inhibitor-1 with plasma insulin, glucose, triglyceride and cholesterol in Chinese patients with diabetes. *Thromb Res* 69: 271-7.
- House C, Kemp BE 1990. Protein kinase C pseudo substrate prototope: structure-function relationship. *Cell Sign* 2: 187-90.
- Huang SM, Leventhal PS, Wieps CJ Bertics PJ 1999. Calcium and phosphatidylserine stimulate the self-association of conventional protein kinase C isoforms. *Biochemistry* 38: 12020-7.
- Huijberts MSP, Schaper NC, Schalkwijk CG 2008. Advanced glycation end products and diabetic disease. *Diabetes Metab Res Rev* 24 (suppl 1): S 19-24.
- Ignarro LJ 1990. Biosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 535-60.
- Igumenova TI 2015. Dynamics and membrane interactions of protein kinase C. *Biochemistry* 54: 4953-68.
- Iishi H, Tatsuta M, Baba M et al., 1995. Suppression by amiloride of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane. *Int J Cancer* 64: 716-9.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403: 795-800.
- Imai SI, Guarente L 2004. NAD⁺ and sirtuins in aging and diseases. *Trends Cell Biol* 24: 464-71.
- Inoguchi T, Battan R, Handler E et al., 1992. Preferential elevation of protein kinase C isoforms beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 11059-63.

- Iwano M, Kubo A, Nishino T et al., 1996. Quantification of glomerular TGF- β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 49: 1120-6.
- Jankun J, Aleem AM, Struniawski R et al., 2009. Accelerated thrombolysis in the blood of plasminogen activator inhibitor deficient mice is inhibited by PAI-1 with a very long-life. *Pharmacol Rep* 61: 673-80.
- Jankun J, Aleem AM, Selman SH, Basrur V, Skrzypczak-jankun E 2009. VLHL plasminogen activator inhibitor spontaneously reactivates from the latent to active form. *Int J Mol Med* 23: 57-63.
- Jankun J, Skrzypczak-Jankun E 2009. Yin and Yang of the plasminogen activator inhibitor. *Pol Arch Med* 119: 410-7.
- Jankun J, Al-Senaidy A, Skrzypczak-Jnakun E 2012. Can inactivators of plasminogen activator inhibitor alleviate the burden of obesity and diabetes. *Int J Mol Med* 29: 3-11.
- Janssen-Heininger YMW, Mossman BT, Heintz NH et al., 2008. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls and promises. *Free Rad Biol Med* 45: 1-17.
- Jove M, Pradas I, Mota-Martorell N et al., 2020. Succination of protein thiols in human brain aging. *Front Aging Neurosc* 12: doi 10.3389/fnagi.2020.00052.
- Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J, Tjian R 1988. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 242: 1566-70.
- Kador PF, Kinoshita JH 1985. Role of aldose reductase in the development of diabetes-associated complications. *Pharmacol Rev* 50: 21-33.
- Kaiser N, Sasson S, Feener EP et al., 1993. Differential regulation of glucose transport and transporter of glucose in vascular endothelial and smooth muscle. *Diabetes* 42: 80-9.
- Kang L, Dunn-Meynell AA, Routh VH et al., 2006. Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucose sensing. *Diabetes* 55: 412-20.
- Kanwar M, Kowluru RA 2009. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the development and progression of diabetic retinopathy. *Diabetes* 58: 227-34.
- Kaur P, Rizk N, Ibrahim S et al., 2013. Quantitative metabolomic and lipidomic profiling reveals aberrant amino acid metabolism in type 2 diabetes. *Mol Biosyst* 9: 307-17.
- Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, et al., 2015. Molecular events linking oxidative stress and inflammation to insulin resistance and β cell dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* article 181643.
- Keranen LM, Dutil EM, Newton AC 1995. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylation. *Curr Biol* 5: 1394-403.
- Khairitdinov RF, Coddington JW, Hurst JK 2000. Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. *Biochemistry* 39: 14238-49.

Kikkawa U, Tanaka Y, Miyake R, Nishizuka Y 1983. Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 258: 11442-5.

Kim VN, Nam JW 2006. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 221: 165-73.

Kinoshita JH 1965. Cataracts in galactosemia. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture. *Invest Ophthalmol* 4: 786-99.

Klover PJ, Mooney RA 2004. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 753-8.

Knopf JL, Lee MH, Sultzman LA et al., 1986. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46: 491-502.

Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, et al., 1976. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 295: 417-20.

Kolleritis B, Lamina C, Huth C et al., 2017. Plasma concentrations of afamin are associated with prevalent and incident type 2 diabetes: a pooled analysis in more than 20.000 individuals. *Diabetes Care* 40: 386-93.

Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED 1998. High glucose-induced transforming growth factor β 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 101: 160-9.

Kook YH, Adamski J, Zelent A, Ossowski L 1994. The effect of antisense inhibition of urokinase receptor in human squamous cell carcinoma of malignancy. *EMBO J* 13: 3983-91.

Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T et al., 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 6494-9.

Koya D, King GL 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47: 859-66.

Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW 1997. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272: 9308-15.

Krinsley JS 2003. Association between hyperglycemia and increased hospital mortality in a heterogeneous population of critically ill patients. *Mayo Clin Proc* 78: 1471-8.

Kwan HC 1992. The plasminogen/plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 11: 291-311.

Lamers ML, Gimenes FA, Nogueira FN et al., 2007. Chronic hyperglycaemia increases TGF beta-2 signaling and expression of extracellular matrix protein in the rat parotid gland. *Matrix Biol* 26: 572-82.

Lapolla A, Brioschi M, Banfi C et al., 2008. Non enzymatically lipoprotein ApOA1 in plasma of diabetic and nephropathic patients. *Annu NY Acad Sci* 1126: 295-9.

Lazarev VE, Guzova IV, Margulis BA 2020. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a multifaceted therapeutic target. *Pharmaceutics* 12:416 doi 103390/pharmaceutics 12050416.

Lee AY, Chung SS 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 13: 23-30.

Lenz AG, Costabel U, Shaltiel S, Levine RL 1989. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal Biochem* 177: 419-25.

Liang S, Figtree G, Aiqun M, Fing Z 2015. GAPDH knockdown reduce rotenone induced H9C2 cells death via autophagy and oxidative stress pathways. *Toxicol Lett* 234: 162-7.

Liochev SI, Fridovich I 1994. The role of O₂ in the production of [•]OH in vitro and in vivo. *Free Rad Biol Med* 16: 29-33.

Lis H, Shanon N 1993. Protein glycosylation-structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218: 1-27.

Liu X, Zheng Y, Guash-Ferre M et al., 2019. High plasma glutamate and low glutamine to glutamate ratio are associated with type 2 diabetes. Case cohort study within the PREDIMED trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 29: 1040-9.

Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, et al., a PJ 1994. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under N- α acetyllysine and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 269: 32299-305.

Lovell MA, Markesbery WR 2008. Oxidatively modified RNA in mild cognitive impairment. *Neurobiol Dis* 29: 169-75.

Lu SC 2000. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* 36: 95-116.

Lu SC 2013. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3143-53.

Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA 1997. O-linked GlcNAc containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272: 9316-24.

Lushchak VI 2007. Free radical oxidation of protein and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry* 72: 809-27.

Lushchak VI 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biol Interact* 224: 164-75.

Lushchak VI 2014. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI J* 13: 922-37.

MacFadyen AJ, Reiter C, Zhuang Y, Beckman JS 1999. A novel superoxide dismutase-based trap for peroxynitrite used to detect entry of peroxynitrite into erythrocyte ghosts. *Chem Res Toxicol* 12: 223-9.

Maisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V et al., 2006. MicroRNA-9 controls the expression of granuphilin/SLP-4 and the secretory response of insulin producing cells. *J Biol Chem* 281: 26932-42.

Maria SS, Lee J, Groves JT 1997. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14243-8.

Mason RM, Wahab NA 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: 1358-73.

McLellan AC, Thornalley PJ, Ben T, Sonksen PH 1994. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (London)* 87: 21-9.

Medzhitov R 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-35.

Mitsuzawa H, Kimura M, Kanda E, Ishihama A 2005. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin associated with RNA polymerase II and interact with its Rpb7 subunit. *FEBS Lett* 579: 48-52.

Miyata T, Maeda K, Kurokawa K, van Ypersele-de-Strihou C 1997. Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. *Nephrol Transpl* 12: 255-8.

Miyata T, van Ypersele-de-Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW 1999. Alteration in non enzymatic biochemistry in uraemia: origin and significance of “carbonyl stress” in long term uraemic complications. *Kidney Int* 55: 389-99.

Miyata T, Saito A, kurokawa K, van Ypersele-de-Strihou C 2000. Advanced glycation and lipoxidation endproducts. Role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol* 11: 1744-52.

Mochly-Rosen D, Das K, Grimes K 2012. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 11: 537-57.

Moka D, Vorreuther R, Schicha H et al., 1998. Biochemical classification of kidney carcinomas biopsy using magic angle spinning 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 17: 125-32.

Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Mel'nikova TI et al., 2019. Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxid Med Cell Longev* article ID 3085756.doi 10.1155

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-42.

Morgenegg G, Winkler GC, Hubscher U et al., 1986. Gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a nonhistone protein and a possible activator of transcription neurons. *J Neurochem* 47: 54-62.

Mugabo Y, Lim GE 2018. Scaffold proteins: from coordinating signaling pathways to metabolic regulation. *Endocrinology* 159: 3515-30.

Nalefski EA, Wisner MA, Chen JZ et al., 2001. C2 domain from different Ca²⁺ signaling pathways display functional and mechanistic diversity. *Biochemistry* 40: 3089-100.

- Neeper M, Schmidt AM, Brett J et al., 1992. A cloning and expression of cell surface receptor for advanced glycosylation endproducts of proteins. *J Biol Chem* 267: 4998-5004.
- Neman M, Linarez-Cruz G, Bruzzoni-Giovanelli H et al., 1996. Activation of the human homologue of the Drosophila Sina gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9039-42.
- Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, Bittencourt PIH 2016. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J* 473: 4527-50.
- Newgard CB, An J, Bain JR et al., 2009. A branched chain amino acid related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contribute to insulin resistance. *Cell Metab* 9: 311-26.
- Newton AC 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9: 161-7.
- Newton AC, Bootman MD, Scott JD 2016. Second messengers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(8) doi 10.1101/cshperspect a 005926.
- Newton AC 2018. Protein kinase C as a tumor suppressor. *Semin Cancer Biol* 48: 18-26.
- Newton AC 2018. Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 53: 208-30.
- Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE et al., 1998. Increased levels of advanced glycation endproducts in lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol Med* 4: 595-601.
- Nicholl ID, Bucala 1998. Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (noisy-le-grand)* 44: 1025-33.
- Nigro C, Leone A, Fiory F et al., 2019. Dicarbonyl stress at the cross roads of healthy and unhealthy aging. *Cells* 9: 749: doi 10.3390/cells 8070749.
- Nishizuka Y 1995. Protein kinase c and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9: 484-96.
- O'Brien J, Morrissey PA 1989. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28: 211-48.
- Obrosova IG 2005. Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 7: 1543-52.
- Olinski R, Siomek A, Rozalski R et al., 2007. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age related diseases. *Acta Biochim Pol* 54: 11-26.
- Opara E 2006. Oxidative stress. *Dis Mon* 52: 183-98.
- Parekh DB, Ziegler N, Parker PJ 2000. Multiple pathway controls protein kinase C phosphorylation. *FASEB J* 19: 496-503.
- Parker PJ, Coussens L, Totty N et al., 1986. The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science* 233: 853-9.

- Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J et al., 2004. A pancreatic islet specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432: 226-30.
- Rabbani N, Thornalley PJ 2012. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino acids* 42: 1087-96.
- Radi R 2013. Peroxynitrite, a stealth biological oxidant. *J Biol Chem* 288: 26464-72.
- Radi R, Denicola A, Morgan B, Zielonka J 2018. Foreword to the free radical biology and medicine special issue on current fluorescence and chemiluminescence approaches in free radical and redox biology. *Free Rad Biol Med* 128: 1-2.
- Radi R 2018. Oxygen radicals, nitric oxide and peroxynitrite redox pathways in molecular medicine. *Proc Nat Acad Sci USA* 115: 5839-48.
- Rahbar S 1968. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 22: 296-8.
- Robison WG Jr, Kador PF, Kinoshita JH 1983. Retal capillaries: Basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. *Science* 221: 1177-9.
- Roberts LD Koulman A, Griffin JL 2014. Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes: progress from metabolome. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2: 65-75.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones, Ashurst JL, Bradley A 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-10.
- Rupaimoole R, Slack FJ 2017. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Rev Drug Discov* 16: 203-22.
- Saliminejad K, Khorshid HRK, Fard SS, Ghaffari SH 2019. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics and analysis methods. *J Cell Physiol* 234: 5451-65.
- Seaquist ER, Anderson J, Childs B et al., 2013. Hypoglycemia and diabetes. A report of a workgroup of the American Diabetes Association and Endocrine Society. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 845-58.
- Schwartz MW, Krinsley JS, Faber CL et al., 2023. Brain glucose sensing and the problem of relative hypoglycemia. *Diabetes Care* 46: 237-44.
- Spyer G, Hattersley AT, MacDonald IA et al., 2000. Hyperglycaemic counterregulation at normal blood glucose concentrations in patients with well controlled type 2 diabetes. *Lancet* 356: 1970-4.
- Scheider M, Knuesting J, Birkholz O, Heinisch JJ, Scheiber R 2018. Cytosolic GAPDH as redox dependent regulator of energy metabolism. *BMC Plant Biol* 18: 1-14
- Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF 2000. AGEs induced oxidative stress and activate protein kinase C beta II in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol* 278: F 676-83.
- Sharma KS, Schaefer AW, Lim H et al., 2017. A six-coordinate peroxynitrite low-spin iron (III) porphyrinate complex product of the reaction of nitrogen monoxide (NO(g)) with ferric-superoxide species. *J Am Chem Soc* 139: 17421-30.

- Sies H Berndt C, Jones DP 2017. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 86: 715-48.
- Singh R, Green MR 1993. Sequence specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science* 259: 365-8.
- Sirover MA 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432: 159-84.
- Sommese RF, Ritt M, Swanson CJ, Sivara-Krisnan S 2017. The role of regulatory domain in maintaining autoinhibition in the multidomain kinase PKC alpha. *J Biol Chem* 292: 2873-80.
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M et al., 2003. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet Lond Engl* 361: 226-8.
- Sruthi CR, Raghu KG 2021. Advanced glycation end products and their adverse effects: the role of autophagy. *J Biochem Mol Toxicol* 35:e22710, doi org 10.1002/jbt.22710.
- Stahelin RV, Wang JY, Blatner NR et al., 2005. The origin of C1A-C2 interdomain interactions in protein kinase C alpha. *J Biol Chem* 280: 36452-63.
- Staveness B, Bosque I, Stephenson CR. 2016. Free radical chemistry enabled by visible light-induced electron transfer. *Accounts Chem Res* 49: 2295-306.
- Steinberg SF 2008. Structural basis of protein kinase C isoforms function. *Physiol Rev* 88: 1341-78.
- Stensman H, Larsson C 2007. Identification of acidic amino acid residues in protein kinase C alpha V5 domain that contribute to its insensitivity to diacylglycerol. *J Biol Chem* 282: 28627-38.
- Sun Q, van Dam RM, Meigs JB et al., 2010. Leptin and soluble leptin receptor levels in plasma and risk of type 2 diabetes in US women: a prospective study. *Diabetes* 59: 611-8.
- Suzuki D, Miyata T, Saotome N et al., 1999. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modifications in proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 10: 822-32.
- Thomas SA, Storey KB, Baynes JW, Frizzell N 2012. Tissue distribution of S-(2-succino) cysteine (-2SC), a biomarker of mitochondrial stress in obesity and diabetes. *Obesity* 20: 263-9.
- Thorens B 2012. Sensing of glucose in brain. *Handb Exp Pharmacol* 209: 277-94.
- Thornalley PJ 1993. The glyoxalase system in health and disease. *Mol Asp Med* 14: 287-371.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS 1999. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344: 109-16.
- Thorpe SR, Baynes JW 2002. CML: a brief history. *Int Congr Ser* 1245: 91-9.
- Thorpe SR, Baynes JW 2003. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* 25: 275-81.

- Tjian R, Maniatis T 1994. Transcription activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 5-8.
- Tobias IS, Newton AC 2016. Protein scaffolds control localized protein kinase C zeta activity. *J Biol Chem* 291: 13809-22.
- Toker A, Newton AC 2000. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103:185-8.
- Trumpower BL 1990. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* 265: 11409-12.
- Tsai LC, Xie L, Dore K et al., 2015. Zeta inhibitory peptide disrupts electrostatic interactions that maintain atypical protein kinase C in its active conformation on the scaffold p62. *J Biol Chem* 290:21845-56.
- Turchinovich A, Tonevitsky AG, Borwinkel B 2016. Extra cellular miRNA: a collision of two paradigms. *Trnds Biochem Sci* 41: 883-92.
- Uribarri J, del Castillo MD, de la Maza MP et al., 2015. Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. *Adv Nutr* : 461-73.
- Ursini F, Maiorino M, Forman HJ 2016. Redox homeostasis: The golden mean of healthy living. *Redox Biol* 8:205-15.
- Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Staface E, Pietraforte D 2019. Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. *Oxid Med Cell Longev article* 8267234. doi 10.1155.
- Wachnowsky C, Hendricks AL, Wesley NA et al., 2019. Understanding the mechanism of [4Fe-4S] cluster assembly on eukariotic mitochondrial and cytosolic aconitase. *Inorg Chem* 58: 13686-95.
- Waldorf GA, Ma Y, Clish C et al., 2016. Metabolic profiles of diabetes incidence and intervention response in diabetes prevention program. *Diabetes* 65: 1424-33.
- Wang TT, Larson MG, Vasan RS et al., 2011. Metabolic profile and the risk of developing diabetes. *Nature Med* 17: 448-53.
- Wurtz P, Soininen P, Kangs AJ et al., 2013. Branched chain and aromatic amino acids are predictors of insulin resistance in youn adults. *Diabetes Care* 36: 648-55.
- Ventura M, Mateo F, Serratos J et al., 2010. Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated by acetylation. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1672-80.
- Vlassara H, Palace MR 2002. Diabetes and advanced glycation end products. *J Intern Med* 251: 87-101.
- White P J, Newgard CB 2019. Branched chain amino acids in disease. *Science* 363: 582-3.
- Williamson JR, Chang K, Frangos M et al., 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42: 801-13.

- Xia P, Kramer RM, King GL 1995. Identification of the mechanism for inhibition of Na⁺K⁺ adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A21. *J Clin Invest* 96: 733-40.
- Zhang AH, Yan GL, Sun GL et al., 2014. Metabolomics study of type 2 diabetes using ultraperformance LC/ESI/quadrupole-TOF high definition MS coupled with pattern recognition methods. *J Physiol Biochem* 70: 117-28.
- Zheng L, Roeder RG, Luo S 2003. S-phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114:255-66.
- Yaribeygi H, Sathyapalant T, Atkin SL, Sahebkar A 2020. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev* article ID 8609213.doi. 10.1155.
- Yan LJ, Christians ES, Liu L et al., 2002. Mouse heat shock transcription factor-1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *EMBO J* 21: 5164-72.
- Yan LJ 2018. Redox Imbalance stress in diabetic mellitus: role of the polyol pathway. *Anim Models Exp Med* 1: 7-13.
- Yang VW 1998. Eukariotic transcriptions factors: identification, characterization and functions. *J Nutr* 128: 2045-51.
- Yego EC, Vincent JA, Sarthy VP, Busik J, Mohr S 2009. Differential regulation of high glucose induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation in Muller cells by IL-1beta and IL-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 1920-8.
- Yki-Jarvinen H, Vogt C, Iozzo P et al., 1997. UDP-N acetylglucosamine transferase and glutamine: fructose-6-phosphate amido transferase activities in insulin sensitive tissues. *Diabetologia* 40: 76-81.
- Zheng L, Roeder RG, Luo S 2003. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S a coactivator complex that contains GAPDH as a key componente. 114: 255-66.
- Zheng L, Kern TS 2009. Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Frontiers Biosci* 14: 3974-87.
- Ziemba BP, Li JN, Landgraf KE et al., 2014. Single molecule studies reveal a hidden key step in the activation mechanism of membrane bound protein kinase C α *Biochemistry* 53: 1697-713.

CAPÍTULO 7- DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DE DIABETES

DEFINIÇÃO E CONCEITO DE DIABETES

Após o primeiro relatório publicado por uma comissão de especialistas da Organização Mundial da Saúde em 1965 [*World Health Organization Expert Committee on Diabetes Mellitus 1965*] o NDDG (*National Diabetes Data Group*) definiu diabetes em adultos de acordo com um de três critérios: (1) uma elevação manifesta do nível de glicose plasmática com sinais e sintomas clássicos de poliúria, polidipsia, perda de peso e cetonúria; (2) um nível de glicose plasmática em jejum FPG (*Fasting Plasmatic Glucose*) igual ou maior que 140 mg/dL ($\geq 7,8$ mmol/L) em mais de uma ocasião; e (3) um nível de glicose plasmática igual ou maior do que 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L) em 2 horas ou outro tempo entre 0-2 horas (em mais de uma ocasião), após um teste de tolerância a glicose, OGTT (Oral Glucose Tolerance Test) de 75 g de glicose via oral [*National Diabetes Data Group. 1979*]. Em 1997, a *American Diabetes Association (ADA)*, através de um relatório elaborado por uma comissão de especialistas, definiu diabetes mellitus como um grupo de doenças metabólicas, caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou na ação da insulina ou ambos [*Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. 1997*]. Já a *Japan Diabetes Society*, por meio de um relatório realizado por uma comissão de especialistas, conceitua diabetes mellitus como um grupo de moléstias caracterizadas por hiperglicemia crônica em razão da ação deficiente da insulina. A deficiência na ação da insulina, uma base comum do diabético, causa anormalidades características no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas [*Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. 2002*]. Em 2014, a ADA publica, “padrões de cuidados médicos” e conceitua diabetes mellitus como uma moléstia crônica complexa, que requer cuidados médicos contínuos, com estratégia de redução do risco multifatorial, além do controle glicêmico [*Standards of Medical Care in Diabetes-2014*]. Segundo publicação de Kerner e Bruckel, [Kerner, Bruckel 2014], diabetes mellitus é o termo geral para distúrbios heterogêneos do metabolismo, para o qual o principal achado é a hiperglicemia crônica. A causa é ou redução da secreção da insulina ou redução na ação da insulina ou ambos. Para a *Canadian Diabetes Association (CDA)*, o diabetes mellitus é uma alteração do metabolismo, caracterizada pela presença de hiperglicemia devido a defeitos na secreção da insulina ou na ação da insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica está associada com complicações microvasculares, de longo prazo, afetando os olhos, rins e nervos, bem como aumento do risco para doenças cardiovasculares [*Clinical Practice Guidelines. 2013*]. Em 2019 a *German Diabetes Association Clinical Practice Guidelines*, define diabetes como um termo coletivo para alterações metabólicas heterogêneas, cujo principal achado é a hiperglicemia crônica. A causa é um distúrbio na secreção de insulina, distúrbio na ação da insulina ou ambos [Petersmann, Muller-Wieland et al 2019].

DIAGNÓSTICO DE DIABETES

Métodos de Determinação da Glicose

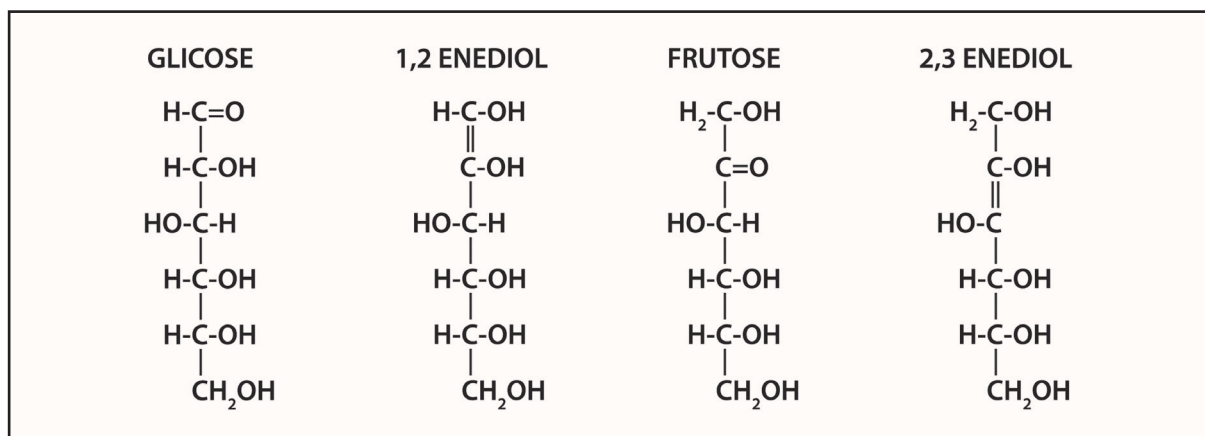
Um ponto muito importante no diagnóstico de diabetes é representado pela quantificação da glicose sanguínea de pacientes, que sofrem distúrbios do metabolismo de carboidrato. A glicose é um carboidrato muito abundante na circulação de mamíferos, sendo o principal combustível para os tecidos periféricos. Assim, a manutenção da concentração da glicose sanguínea deve ser muito controlada. Sempre após a ingestão de alimentos (pós-prandial) a concentração de glicose

se eleva de forma transitória, uma vez que ela é captada por tecidos como o adiposo, muscular, renal e fígado, o qual além de captar a glicose e transformá-la em glicogênio, uma forma de reserva e quando necessário ela mobiliza o glicogênio para repor a glicose no sangue. Muitos hormônios afetam a homeostase da glicose, sendo a insulina a que ocupa um lugar de destaque. Além da insulina o glucagon, a adrenalina, o cortisol e o hormônio do crescimento, também participam no controle da glicose [Cryer 1981; Burrin, Price 1985]. α

A glicose é um monossacarídeo constituído por seis átomos de carbono, dos quais cinco com grupos hidroxilas (-OH) e um carbono com grupo aldeídico (-CHO). Em solução a glicose se apresenta sob várias formas diferentes, a predominância de uma dada forma é função do pH e do solvente. Assim em solução levemente ácida ou neutra a forma predominante é a semi-acetálica, conhecida como piranose.

Em solução alcalina a glicose sofre o processo de enolização, formando os chamados enedíois (Figura 7.1). Estes são compostos altamente reativos, sendo facilmente oxidados pelo oxigênio ou agentes oxidantes. Em solução alcalina a glicose atua como um agente redutor. Como consequência, os enedíois podem reduzir íons como o mercúrio (Hg^{2+}), bismuto (Bi^{3+}), cobre (Cu^{2+}) e ferricianeto ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) e se transformarem em ácidos. A forma enediol da glicose foi durante algum tempo utilizada como teste químico da glicose para reduzir cobre em meio alcalino [Burrin, Price 1985].

Figura 7.1 - Fórmulas de enedíois derivadas da glicose em meio alcalino



No entanto, é preciso ressaltar, que o enediol pode ser proveniente não só da glicose como também da frutose e manose. Esses três monossacarídeos diferem apenas no segundo átomo de carbono. Logo qualquer teste para determinar a glicose, baseado no enediol não diferencia entre os três monossacarídeos. A glicose pode ser medida no plasma, soro, sangue total ou amostras desproteinizadas e os valores obtidos vão depender do tipo da amostra coletada.

Valores do plasma são aproximadamente de 12 a 13% maiores do que no sangue total. Isto se deve ao conteúdo de água dos eritrócitos (73%) ser menor do que no plasma (93%) e porque também a glicose se difunde entre plasma e eritrócitos [Burrin, Price 1985].

Um dos métodos antigos para a determinação da glicose baseia-se no uso de uma quantidade conhecida de ferricianeto ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) [Hagedorn, Jensen 1923]. Nesse método, como é usado uma quantidade conhecida de ferricianeto, a parte de ferricianeto que não reagiu é quantificado por titulometria com tiosulfato de sódio. Posteriormente, surgiram modificações do método para usar medida espectrofotométrica. O ferrocianeto formado reage com o ácido fosfomolibdico e acrescentando excesso de íon férrico a mistura forma um produto colorido, cuja intensidade de cor é medida num espectrofotômetro [Kidby, Davidson 1973; Fingerhut, Ferzola, Marsh 1963;

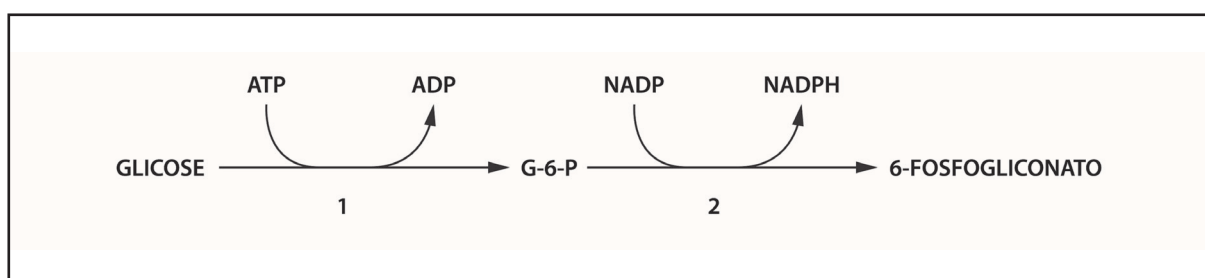
Mateles 1960].

Um método de determinação da glicose muito usado até hoje é o da O-toluidina. Este método se baseia na propriedade da glicose de se condensar com aminas aromáticas em solução acética aquecida, para dar o produto glicosilaminas coloridas [Hultman 1959].

O método foi melhorado, comparado ao método original de Hultman, adicionando tiouréia ao reagente, com a finalidade de estabilizar a cor formada. [Nyvarinen, Nikkila 1962]. Outra modificação ocorreu em 1973, em que o ácido acético foi substituído por ácido glicólico, tiouréia e propilenoglicol, fornecendo uma cor satisfatória, sem a necessidade de usar o ácido acético glacial, um produto muito irritante [Yamashita, Watanabe 1973]. O princípio do método se baseia na condensação da glicose com amina aromática, em ácido acético, formando em equilíbrio uma mistura de glicosilamina e base de Schiff [Dubowski 1962; Dubowski 2008].

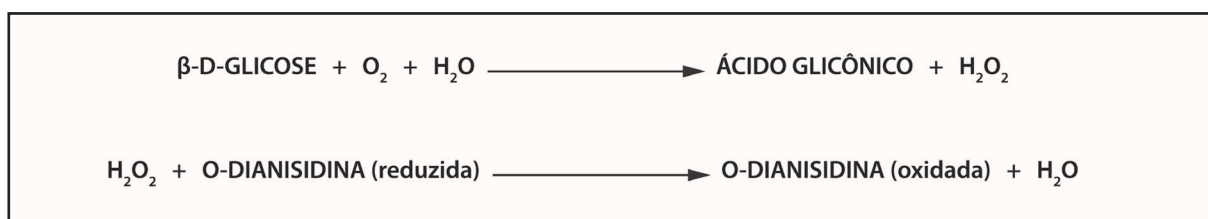
Métodos enzimáticos são também empregados para a determinação da glicose. Assim, o uso da enzima hexoquinase (HK) acoplada a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) é um método simples, sensível e específico, cuja leitura pode ser feita num espectrofotômetro. O princípio do método é a conversão da glicose para glicose-6-fosfato (G-6-P) pela ação da hexoquinase (Figura 7.2), tendo como cofator a adenosina trifosfato (ATP). A glicose-6-fosfato formada é por sua vez convertida a 6-fosfogliconato, uma reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, tendo como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP).

Figura 7.2 - Reações que ocorrem na determinação da glicose pelas enzimas : 1- hexoquinase (HK) e 2- glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD)



O NADPH formado na reação catalisada pela enzima G-6-PD é proporcional a glicose presente e é monitorada num espectrofotômetro a 340 nm. Na realidade, a conversão de glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato envolve um intermediário a 6-fosfogliconato-lactona, que sofre desidratação para formar o 6-fosfogliconato. As especificidades, da hexoquinase (HK) e da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) limitam a interferência de outros carboidratos [Passey, Gillum et al., 1977]. Esse método pode ser usado como ensaio cinético estabelecendo-se condições para isso, em que a alteração da absorbância que resulta da redução do NADP pode ser usada num programa de regressão linear [Mielsing, Pardue et al., 1979]. Posteriormente foi desenvolvido uma estratégia cinética de tempo fixo e usando inibidor de ATP que permitiu medir amostras de glicose contendo até 55,5 mmol/L num auto analisador [Deeg, Kraemer, Ziegenhorn 1980].

A glicose oxidase é outra enzima muito utilizada no controle de diabéticos e que ganhou considerável importância devido a multitude de aplicações como na química farmacêutica, alimentação, clínica química, biotecnologia, e outras indústrias [Bankar, Bule et al., 2009]. A glicose oxidase é uma flavoproteína, que catalisa a oxidação da glicose a δ -gliconolactona e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), usando o oxigênio molecular como aceptor de elétrons [Pluschkell, Hellmuth, Rinas 1996; Hatzinikolaou, Hansen et al., 1996]. Proteínas fortemente associadas com a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina adenina mono nucleotídeo (FMN) são chamadas flavoproteínas (Figura 7.3).

Figura 7.3 - Reações que ocorrem na determinação da glicose usando glicose oxidase (GO) e peroxidase (PRX)

A glicose oxidase é uma enzima altamente específica para a β -D-glicose, porém mesmo altamente purificada, a enzima contém mutarrotase, permitindo uso da glicose oxidase para a determinação da glicose em solução contendo em equilíbrio uma mistura de isômeros [Burrin, Price 1985]. O intermediário δ -gliconolactona é espontaneamente hidrolisado a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio [Bentley, Neuberger 1949]. O peróxido de hidrogênio formado é usado para oxidar um corante, de modo que a cor possa ser monitorada. São usados como corantes a O-dianisidina, ou a ABTS (2,2'-azino-di-(3 etilbenzotiazolina)-6-sulfonato) reduzidos, e a oxidação desses corantes são medidos espectrofotometricamente, e os resultados obtidos dão a medida da glicose que foi oxidada. A glicose oxidase é uma enzima muito usada nos chamados biossensores.

BIOSSENSORES DA GLICOSE

A tecnologia de biossensores tem se desenvolvido de forma rápida e pode desempenhar um papel chave fornecendo ferramenta analítica, particularmente na medicina [Yoo, Lee 2010]. A pergunta que nos vem a mente neste momento é: o que é um biossensor? Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico compacto ou unidade, que incorpora um elemento biológico de reconhecimento sensível, integrado ou associado a um transdutor físico-químico [Turner 2000]. Transdutor é qualquer dispositivo capaz de transformar uma forma de energia em outra. Biossensores são dispositivos analíticos capazes de converter uma resposta biológica em sinal elétrico [Bollella, Katz 2020]. Por outro lado, um biossensor é geralmente definido como um dispositivo detector constituído de um elemento de reconhecimento biológico, em íntimo contato com um transdutor adequado, que é capaz de converter a reação biológica reconhecível ou o processo biocatalítico num sinal mensurável. Geralmente, as enzimas são os componentes mais usados nos biossensores [Freire, Pessoa et al., 2003].

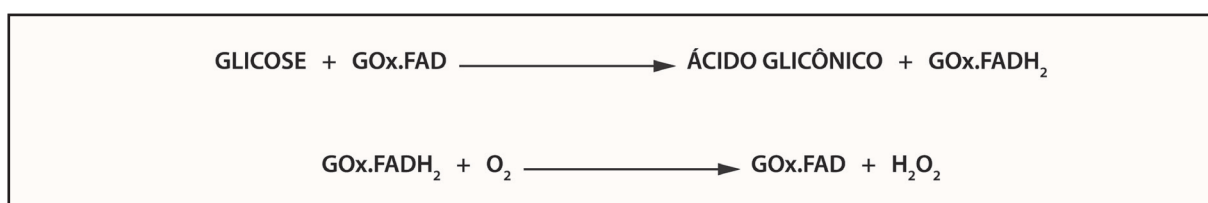
Um biossensor é constituído por três partes principais: (1) um elemento de reconhecimento biológico, que diferencia a molécula alvo; (2) um transdutor, que converte o evento reconhecível num sinal mensurável e (3) um sistema de processamento de sinal, que converte o sinal numa forma que pode ser medida [Clark, Lyons 1962; Updike, Hicks 1967; Hiratsuka, Fujisawa, Muguruma 2008].

Um relatório técnico elaborado pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), fez recomendações sobre definição, classificação e nomenclatura relacionada a biossensores eletroquímicos [Thenevot, Toth et al., 2001]. De acordo com esse relatório, um biossensor eletroquímico é um dispositivo integrado, capaz de fornecer informações analíticas específicas, quantitativas ou semiquantitativas, usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), que é retido num contato espacial direto com o transdutor eletroquímico. Entre os diferentes tipos de biossensores, os eletroquímicos ganharam atenção especial pelos pesquisadores da comunidade científica [Kalcher 2017]. Os biossensores eletroquímicos são classificados em dois grupos: os amperométricos e os potenciométricos [Batoool, Rhouati et al., 2019]. Os biossensores amperométricos se baseiam em sinal eletroquímico redox, produzido sob

determinado potencial. O método amperométrico usado comumente, em sensores eletroquímicos, funciona pela produção de uma corrente, quando um potencial é aplicado entre dois eletrodos e a molécula sofre ou é envolvida numa reação redox que pode ser monitorada medindo a corrente numa célula eletroquímica. Os biossensores potenciométricos fazem uso de eletrodos íon-seletivos para traduzir a reação biológica num sinal elétrico. Em outros termos, ele consiste numa membrana de enzima imobilizada, circundando uma sonda de um pHmetro, onde a reação catalisada gera ou absorve íons hidrogênio. Uma célula eletroquímica é um dispositivo, através do qual, a redução na energia livre de um sistema num processo espontâneo, pode ser transformada num trabalho elétrico. O processo envolvido pode ser uma reação química ordinária, sendo o requisito essencial um processo de oxidação/redução (redox).

O primeiro biossensor foi descrito em 1962 [Clark, Lyons 1962]. Este primeiro biossensor era composto de um eletrodo de oxigênio, uma membrana interna semipermeável de oxigênio e uma fina camada de glicose oxidase aprisionada por uma membrana de diálise. A redução do nível de oxigênio era proporcional a concentração de glicose resultante da oxidação da glicose a β D-glicono δ - lactona, catalisada pela enzima [Magner 1998]. Um sensor químico transforma a informação química num sinal analiticamente útil. Um sistema de reconhecimento biológico (receptor) e um transdutor físico-químico são os dois componentes básicos de sensores químicos. O principal objetivo do sistema de reconhecimento biológico é o de prover o sensor, com alto grau de seletividade para a substância a ser analisada. Os elementos de reconhecimento molecular incluem receptores, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos microorganismos e lectinas [Chambers, Arulananda et al., 2000; Iqbal, Mayo et al., 2000]. O transdutor, por sua vez, é o componente do biossensor, que usa as alterações que ocorrem numa dada reação. Entre os vários princípios utilizados para medir a glicose, a maior parte dos sensores desenvolvidos são baseados nos sensores de glicose amperométricos. Já vimos, que os biossensores amperométricos são aqueles dispositivos que acompanham o movimento de elétrons produzidos nas reações de oxidação/redução (redox). Nesses biossensores a glicose é convertida a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), numa reação catalisada pela enzima glicose oxidase (GOx) (Figura 7.4).

Figura 7.4 - Reação catalisada pela glicose oxidase com formação de ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). GOx.FAD = glicose oxidase



O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado é oxidado eletroquimicamente num eletrodo. Já vimos anteriormente, que a glicose oxidase é uma flavoproteína, que contém como grupo prostético, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Enquanto a glicose é oxidada, o cofator (FAD) é reduzido (FADH₂). O cofator reduzido (FADH₂) é regenerado, reagindo com o oxigênio formando o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é oxidado num eletrodo de platina. O eletrodo reconhece facilmente o número de elétrons. A flavina adenina dinucleotídeo (FAD), assim como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), é um transportador de elétrons e é uma coenzima, cuja forma oxidada é representada por FAD e a reduzida por FADH₂. A parte reativa do FAD é o anel isoaloxazínico, um derivado da vitamina do complexo B, a riboflavina. FAD pode aceitar 2 elétrons e 2 prótons transformando-se no FADH₂ (figura 7.9). A busca por biossensores sensíveis, seletivos e estáveis, tem sido o foco dos pesquisadores da área de equipamento de transferência de elétrons [Wu, Hu 2007]. O acoplamento eletrônico entre a enzima redox e os eletrodos para o desenvolvimento de biossensores, pode ser alcançado

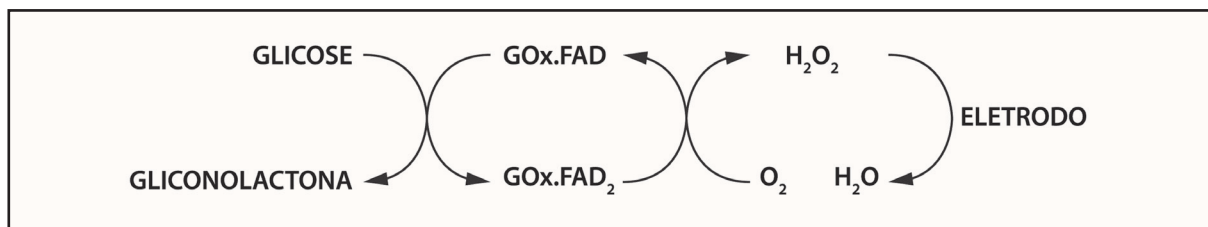
de acordo com três mecanismos denominados, biossensores de primeira, segunda e terceira geração. As enzimas utilizadas nos biossensores são as oxido-redutases, que compreendem as desidrogenases, as oxigenases e as oxidases. Estas últimas, incluem as flavoproteínas sendo a glicose oxidase a mais usada. Como já vimos, essa enzima catalisa a oxidação da glicose a gliconolactona, usando o oxigênio molecular como aceptor de elétrons [[Bankar, Bule et al., 2009]. A gliconolactona formada é desidratada, dando origem ao ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), usando o oxigênio molecular como aceptor de elétrons

Os biossensores de primeira geração se baseiam na eletroatividade do substrato ou produto da reação enzimática. Numa primeira etapa o biocatalisador dentro do biossensor responde ao substrato catalisando a reação específica:

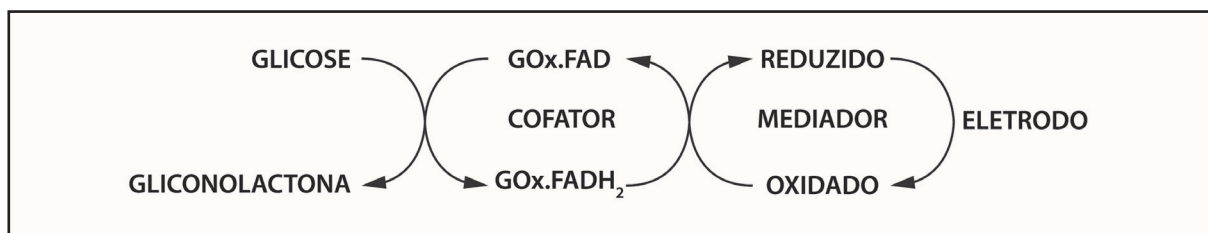


A taxa da reação é medida ou pela produção de ácido glicônico, usando um eletrodo de pH, monitorando a queda no pH, ou então medindo o H_2O_2 formado pela oxidação num eletrodo de platina [Karyakin, Gitelmacher, Karyakina 1995; Abel, von Woedtke 2002; Murugaiyan, Ramasamy et al., 2014]. Os biossensores de primeira geração são dependentes de oxigênio, como aceptor de elétrons, de modo, que a quantidade de oxigênio é um fator limitante (déficit de oxigênio), que controla as alterações nas respostas do sensor [Clark 1956](Figura 7.5).

Figura 7.5 - Sequência da oxidação da glicose pelos biossensores de primeira geração



Já os biossensores de segunda geração se baseiam na transferência de elétrons usando os chamados mediadores (relés), os quais são moléculas pequenas eletroativas, que lançam elétrons entre o sítio da enzima e o eletrodo [Scheller, Schubert et al., 1991]. Como a glicose oxidase não transfere os elétrons diretamente aos eletrodos tradicionais, a utilização de um aceptor de elétrons (mediador), que lança os elétrons entre o sítio da enzima e o eletrodo resolve a deficiência de oxigênio [Zhu, Garcia-Gancedo et al., 2012]. Os mediadores mais usados são ferrocene, quinona e corantes, como azul de metileno e outros [Turner, Piletsky 1999; Cass, Davis et al., 1984]. Esses mediadores podem ser difusíveis ou ligados a cadeia lateral do polímero redox flexíveis. Polímeros redox como polivinilpiridina ou polivinilimidazol, ligados covalentemente com relés eletrônicos, reduzem a distância entre o centro redox do polímero e o centro FAD da enzima, o que leva a alta produção de corrente e rápida resposta sensora [Pischko, Katakis et al., 1990]. Nesta classe, incluímos todas as enzimas que usam nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), livremente difusíveis como aceptor primário de elétrons, que mais tarde precisam de um catalisador imobilizado, para reoxidar o NADH [Gorton, Dominguez 2002]. Enquanto, os biossensores de primeira geração usam alto potencial, nos biossensores de segunda geração (Figura 7.6) a presença de mediadores, reduz o potencial aplicado.

Figura 7.6 - Mecanismo da oxidação da glicose pelos biosensores de segunda geração

Nanomateriais, como nanopartículas de ouro ou nanotubos de carbono são também, usados como conectores elétricos entre o eletrodo e o centro FAD. No entanto, os mediadores redox usados juntamente com enzimas redox, facilitam não somente a transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima, mas, também várias reações interferentes [Gorton, Lindgren et al., 1999; Freire, Pessoa et al 2003].

Nos biosensores de terceira geração a transferência de elétrons ocorre diretamente da reação catalisada, que converte o substrato a produto. A enzima redox atua como um eletrocatalisador, facilitando a transferência de elétrons entre o eletrodo e a molécula do substrato sem o envolvimento de um mediador [Ghindilis, Atanasov, Wilkins 1997]. A transferência direta de elétrons da enzima redox para o eletrodo oferece melhor seletividade, pois são capazes de operar num intervalo de potencial perto do potencial redox, ficando menos expostos a reações interferentes [Freire, Pessoa et al., 2003].

BIOSSENSORES DE USO DIÁRIO

Os biosensores eletroquímicos são dispositivos adequados para uso diário em casa para medir a glicemia. A grande maioria dos monitores de glicose sanguínea, dependem de fitas descartáveis com enzimas redox e o eletrodo impressos e produzidos por microfabricação [Newman, White et al., 1995; Wang 2008]. Como vimos anteriormente, a enzima mais comumente usada nos biosensores para a medida de glicose contém grupos redox, que alteram o estado redox durante a reação bioquímica. Enzimas desse tipo são a glicose oxidase (GOx) e a glicose desidrogenase (GDH). Essas oxidasas e desidrogenases atuam oxidando seus substratos, aceitando elétrons no processo passam a um estado reduzido. Essas enzimas são reoxidadas pela transferência de elétrons ao oxigênio molecular resultando na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2):



Para a análise da glicose, a glicose oxidase (GOx) (ou a glicose desidrogenase (GDH)) é imobilizada entre duas camadas de membranas. A membrana externa de policarbonato retém a enzima, permite a passagem de glicose, mas previne a passagem de moléculas grandes, reduzindo interferências. A glicose entra na camada de enzima, onde é oxidada produzindo H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio passa através de uma membrana de acetato de celulose até o eletrodo de platina, onde é medida amperometricamente. A segunda membrana atua como uma barreira posterior de exclusão prevenindo outras moléculas interferentes (eletroativos) de alcançar o eletrodo [Newman, Turner 2005].

Em resumo, o princípio do teste se baseia em medir a intensidade elétrica produzida pela reação da glicose com os reagentes (enzima redox) e eletrodo. A reação da glicose do sangue com a glicose oxidase ou glicose desidrogenase, dependentes de FAD, causa a passagem de elétrons das moléculas de glicose ao cofator (neste caso o FAD) e então ao mediador e deste para o eletrodo no sensor. Os elétrons produzidos são proporcionais ao nível de glicose, que é determinado pela medida e mostrado num visor. Embora, existam biossensores disponíveis no comércio para moléculas pequenas como lactato, ácido úrico, lactose e outros, 90 % do mercado é dominado pelos sensores de glicose para diabéticos [Wang 2008]. Os sensores de glicose comerciais, de uso em casa, podem detectar a glicose no intervalo de 1,1 a 3,33 mM (19,8 mg/dL a 599,4 mg/dL) [Ronkainen, Halsall, Heineman 2010].

O progresso tecnológico para aprimorar os biossensores é uma área que está se desenvolvendo muito rapidamente. Dessa forma, a nanotecnologia apareceu com larga aplicação nos mais diversos setores. Com estratégias de nanotecnologia, dispositivos ou materiais têm sido produzidos em nano-escala (< 100 nm) para aplicações. Assim, eletrodos nanoporosos, como o ouro nanoporoso, que apresenta grandes áreas superficiais, estabilidade química e biocompatibilidade tem sido usados [Juarez, Biener et al., 2017]. Outro material nanoporoso, que também, está sendo utilizado é o grafeno, um material constituído por uma folha plana, da espessura de um átomo, em camada bidimensional de carbono, com estruturas hexagonais, semelhantes ao favo de abelha [Novoselov, Geim et al., 2004]. O estudo do grafeno conferiu a Konstantin Novoselov e Andre Geim o prêmio Nobel de física em 2010. O grafeno tem sido produzido para ser um material transdutor e sua estratégia sensora foi melhorada com a miniaturização pela integração para testes de cuidados pontuais (*point-of-care*) [Fenzl, Nayak et al., 2017]. Os grupos funcionais do grafeno podem capturar moléculas para analisar suas interações com alvos específicos.

A tecnologia microfluídica é importante nos biossensores para transporte de amostras, mistura de reagentes, fornecendo uma câmara de reação para a imobilização de molécula biossensores de reconhecimento biológico, iniciando as biorreações e a subsequente entrega da mistura de reagentes biossensores à interface do transdutor [Loo, Ho et al., 2019]. O termo microfluido significa a atuação de fluido ou gota com volumes menores do que microlitro (μL), variando caracteristicamente de picolitro (pL) ($1 \text{ pL} = 10^{-12} \text{ L}$) a μL ($1 \mu\text{L} = 10^{-6} \text{ L}$). Apesar do avanço tecnológico na área, a maioria dos sensores de glicose se baseiam nos biossensores de segunda geração, isto é, biossensores que usam mediadores.

BIOSSENSORES NÃO INVASIVOS

A tecnologia de cuidados da saúde tem se desenvolvido rapidamente e sem dúvida é uma parte importante de pesquisa e desenvolvimento. As medidas não invasivas são realizadas com fluidos biológicos como saliva, lágrima, suor e urina.

DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DA SALIVA

O diagnóstico através da saliva é esperado facilitar o diagnóstico clínico não invasivo de uma forma rápida e fácil acessibilidade [Campuzano, Yanez-Sedeno, Pingarron 2017; Amer, Yosuf 2001]. A saliva, no homem é o produto da secreção de glândulas salivares maiores, isto é, parótida, submandibular e sublingual, bem como de numerosas glândulas menores espalhadas na cavidade bucal. As glândulas parótidas, localizam-se sob as orelhas e sua saliva alcança a cavidade oral via ducto de Stenson, situado na mucosa bucal perto do segundo molar. As glândulas submandibulares, por sua vez localizam-se no ponto médio da mandíbula, enquanto as

sublinguais estão localizadas sob a língua, no assoalho da boca. As salivas produzidas por essas duas glândulas chegam à cavidade oral via ducto de Wharton localizado no assoalho da boca.

Neste ponto é importante conceituarmos os termos saliva e fluido oral. Saliva nada mais é do que o produto de secreção das glândulas salivares, livre de outros materiais, enquanto o fluido oral é a mistura de saliva com o fluido gengival (fluido crevicular) e contém outros materiais que podem estar presentes na boca, como células de descamação e resíduos alimentares. As glândulas salivares são constituídas por duas regiões anatômica e funcionalmente distintas, a saber as regiões, acinar e ductal. As glândulas salivares apresentam dois processos celulares distintos, porém integrados, isto é, a produção de fluido primário de secreção constituído por água e eletrólitos e a secreção de proteínas conhecida como processo exocitótico. O termo exocitose é aplicado ao transporte de moléculas para fora da célula, um processo que envolve a fusão de grânulos de secreção com a membrana plasmática e subsequente liberação. Ambos os processos são controlados pelo sistema nervoso autônomo, o simpático e parassimpático. De um modo geral, a estimulação parassimpática fornece uma saliva rica em água e baixo teor de proteínas, enquanto, a estimulação simpática produz secreção de saliva rica em glicoproteínas, sendo por isso mais viscosa. O mecanismo pelo qual os neurotransmissores induzem o processo secretório se baseia nos receptores superficiais específicos na membrana basolateral. A composição da saliva produzida por qualquer tipo de glândula varia com o fluxo, que por sua vez varia com o tipo, intensidade e duração do estímulo. Logo, qualquer estudo em que se pretende usar a saliva é preciso ter em mente que o cálculo do fluxo salivar se torna extremamente importante para a interpretação dos resultados. A contribuição de cada glândula varia considerando o repouso, estímulo ácido e mecânico. Constituintes séricos podem alcançar a saliva via fluido crevicular e também, por meio de transporte, por via transcelular, incluindo aqui os processos de difusão passiva e transporte ativo (consumidor de energia) e por via paracelular, que inclui a ultrafiltração.

Glicose, lactato, fosfato, hormônios, biomarcadores de câncer têm sido identificados entre os biomarcadores salivares [Malon, Sadir et al., 2014]. Qual o significado do termo biomarcador? A literatura apresenta várias definições de biomarcadores. O termo biomarcador refere-se a uma larga subcategoria de sinais médicos, que é uma indicação objetiva do estado médico observado no paciente, que pode ser medida de forma precisa e reproduzível [Strimbu, Tavel 2010]. Em 1998, um grupo de tarefa para definição de biomarcadores, do Instituto Nacional de Saúde (*National Institute of Health*) definiu um biomarcador como uma característica, que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processo patogênico ou respostas farmacológicas a intervenção terapêutica [*Biomarkers Definition Working Group 2001*]. Outra definição para biomarcadores, da Organização Mundial da Saúde [Gug, Tertis et al., 2019], estabelece biomarcador como qualquer substância mensurável, seu metabolito, estrutura ou processo ou uma medida refletindo a interação entre um sistema biológico ou ameaça de potencial lesão no corpo humano, que pode predizer a incidência de doenças. Para fins de diagnóstico a saliva pode ser coletada ou de glândulas individuais (parótidas e submandibulares/sublinguais) ou então a saliva total (saliva mista). A coleta da saliva de glândulas individuais requer que o profissional tenha familiaridade com a metodologia. Por isso, a saliva total de fácil coleta é a mais usada para fins de diagnóstico. Contudo, é preciso ressaltar, que a padronização da coleta de saliva constitui num fator importante para análise salivar, já que ela pode estar contaminada com microorganismos, células de descamação e resíduos alimentares [Ilea, Andrei et al., 2019]. A saliva apresenta um grande número de biomarcadores, que podem ser usados para análise clínica e teste de diagnóstico de várias doenças [Ilea, Andrei et al 2019]; Kim, Campbell et al., 2019; Zhang, Du, Wang 2015]. A saliva mista é a mais frequentemente usada para fins de diagnóstico, por ser de fácil coleta, não é invasiva, contém constituintes séricos. Sendo não invasiva, os indivíduos têm a chance de se submeterem a exames sem o desconforto da coleta de sangue [Will, Tjalling et al., 2007]. Cerca de 20% das proteínas encontradas na saliva estão

presentes no plasma, sendo que as proteínas em ambos os fluidos mostram diversidades funcionais comparáveis e ligados a doenças [Zhang, Sun et al., 2013]. É importante, neste ponto abordarmos a tecnologia do diagnóstico. Cinco níveis básicos de análise, a fim de avaliar a efetividade de qualquer teste devem ser considerados: (1) nível analítico, significando que o método que for escolhido deve ser exato e acurado; (2) nível de diagnóstico, isto é, o método de escolha deve apresentar sensibilidade e especificidade para o biomarcador; (3) nível de eficiência para o paciente, isto é, o método utilizado deve possibilitar uma decisão médica; (4) nível operacional, isto é, valor e eficiência no diagnóstico e (5) nível custo/benefício, isto é, um método, que além de preencher todos os requisitos acima mencionados, deve fornecer o valor prático de informação derivado do teste de diagnóstico para o gerenciamento do paciente.

A determinação da glicose se reveste de muita importância para o diagnóstico e controle de diabetes. Atualmente, existem dispositivos para tal, porém requerem uma picada no dedo para obter o sangue necessário para o teste, que realizado uma ou mais vezes por dia, causa desconforto ao paciente. Em razão disso, a busca para uma metodologia não invasiva, que possa usar fluidos corporais tem chamado a atenção dos pesquisadores. No entanto, para que a saliva possa ser usada como substituta do sangue para a determinação de glicose no diabetes, é preciso, saber se há uma correlação positiva entre o teor de glicose salivar e o teor de glicose sanguínea. Diferentes publicações estabeleceram uma correlação positiva entre a concentração da glicose salivar e a do sangue [Ilea, Andrei et al., 2019; Kim, Campbell et al., 2019; Zhang, Du et al., 2015; Pappa, Curto et al., 2016; Du, Zhang, Wang 2016; Gupta, Nayak et al., 2017; Agrawal, Sharma et al., 2013; Mascarenhas, Fatela, Barahona 2014; Arakawa, Kuroki et al., 2016]. Essas publicações foram importantes no sentido do desenvolvimento de plataformas biossensíveis para a detecção da glicose salivar. Nesse contexto, a literatura nos mostra os esforços dos pesquisadores no desenvolvimento de um dispositivo não invasivo para a determinação da glicose salivar. Um sistema que combinou a análise de injeção de fluxo e eletrodo de oxigênio foi desenvolvido e publicado em 1998. [Yamaguchi, Mitsumori, Kano 1998]. Nesse mesmo ano, esse grupo publicou uma melhoria no sistema substituindo o eletrodo de oxigênio pelo eletrodo de peróxido de hidrogênio [Mitsumori, Yamaguchi, Kano 1998]. Entre os vários sensores desenvolvidos para determinação da glicose salivar podemos citar um sensor ótico, não invasivo usando glicose oxidase imobilizada e um pigmento responsivo a pH, sobre papel de filtro e a alteração da cor observada é detectada com câmera de Smart phone e aplicativo [Soni, Jha 2017]. Contudo, as diferenças que existem entre os Smartphones podem alterar o produto do aplicativo.

O desenvolvimento de um transistor eletroquímico orgânico OET (*Organic Electrochemical Transistor*), cuja plataforma converte a detecção de moléculas bioquímicas em corrente elétrica, possibilitando a medida dos níveis de glicose num fone móvel portátil ou para uso em casa. Os OETs com camada de glicose oxidase tem mostrado sensibilidade seletiva para glicose [Liao, Mak et al., 2015].

LÁGRIMA E DETERMINAÇÃO DA GLICOSE

O termo lágrima refere-se ao fluido, presente como um filme, que circunda os tecidos oculares, composto de moléculas orgânicas, proteínas, glicose e eletrólitos [Zhao, Leung 2020], cujas características podem refletir as condições fisiológicas e o estado de saúde [Xiong, Zhang et al., 2018]. O volume da lágrima relatado na literatura é de cerca de 5 a 10 μL [Mishima, Gasset et al., 1966; Scherz, Doane, Dohlman 1974]. A secreção normal é de 1 a 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Contudo, a produção da lágrima sofre a influência de terapia, podendo ser maior ou menor [van Haeringen 1981]. A estrutura do filme lacrimal é ímpar o que lhe possibilita realizar várias funções, com os componentes lipídicos, aquosos e mucosos. Tem também uma interface de glicocálix, contendo

mucina que se estende da membrana apical da córnea e o epitélio conjuntival, que atua como parte integrante do filme lacrimal [Ohashi, Dogru, Tsubota 2006]. Glicocalix é uma capa de células, espessa, de glicoproteínas e glicolípídeos que impede a aproximação de macromoléculas.

A camada mais superficial é de natureza lipídica, apresentando uma espessura de cerca de 100 nm. Sua função é a de prevenir a evaporação da camada subjacente, a aquosa, fornecendo uma superfície lisa sobre a córnea [Bron, Tiffany et al., 2004]. A camada lipídica é formada por lipídeos polares e não polares. Os lipídeos polares interagem com a fase aquosa do filme lacrimal, se espalham nos componentes não polares, que forma o grosso do filme [Tiffany 1987]. Ela é composta por cerca de 44% de ésteres de cera (ésteres de ácidos graxos com álcoois de cadeia longa), 33% de ésteres de esteróis, 5% de triglicerídeos, 2% de diglicerídeos, além de componentes menores [James, McCulley et al., 2003]. Abaixo da camada lipídica tem uma fase aquosa, cuja espessura é de aproximadamente 3,3 μm [King-Smith, Fink et al., 2004]. Abaixo da camada de água do filme lacrimal tem uma camada de mucina, responsável pela lubrificação da superfície ocular, apresentando uma espessura de cerca de 30 μm [Bron, Tiffany et al., 2004]. Mucinas são glicoproteínas, isto é, um complexo de carboidratos e proteínas, sendo os principais constituintes do muco, um material viscoso. Apresentam alto peso molecular com uma característica comum, que incluem um peptídeo central, chamado apomucina, rica em resíduos de serina, treonina e prolina, de onde saem as cadeias laterais oligossacarídicas, caracterizadas pela presença de hexosaminas, hexose e ácido siálico (ácido N-acetil-neuraminico). Foram identificados, 20 diferentes mucinas (MUC), que receberam números de MUC-1 a MUC-20. Entre as mucinas identificadas na lágrima destacamos, MUC-1, MUC-2, MUC-4, MUC-7, MUC-16, MUC5AC e MUC-AB [Argueso, Spurr-Michaud et al., 2003; Inatomi, Spurr-Michaud et al., 1996; Jumblatt, McKenzie et al., 2003; McKenzie, Jumblatt, Jumblatt 2004].

Na lágrima humana, foram identificados, mais de 60 proteínas [Li, Wang et al., 2005]. Entre essas proteínas podemos destacar a lisozima, a lactoferrina, EGF (*epidermal growth factor*) e IgA. A lisozima é uma enzima com atividade antimicrobiana. O termo lisozima é derivado da palavra liso, pela sua capacidade de lizar bactéria, e zima por ser uma enzima. A lisozima consegue lizar certas bactérias agindo sobre o polissacarídeo presente na parede bacteriana. A molécula da lisozima é relativamente pequena, 14,6 KDa, altamente estável e contendo quatro ligações dissulfetos (-S-S-). Compreende cerca de 20 a 40% de toda a proteína lacrimal [Farris 1985], sendo a mais alta no filme lacrimal em comparação com outros fluidos corporais. A glândula lacrimal humana, também produz outras proteínas como a lactoferrina e o fator de crescimento epidermal (EGF). A lactoferrina é uma glicoproteína ligadora de ferro (Fe^{3+}) e está presente nas secreções como leite, lágrima e saliva. O conteúdo de ferro da proteína varia, mas nunca chega ao valor de saturação. Apresenta atividade bactericida [Arnold, Cole, McGhee 1977], podendo atuar contra radicais livres [Guttridge, Paterson et al., 1981]. O fator de crescimento epidermal (EGF) é um polipeptídeo de 6 KDa, que estimula o crescimento das células epiteliais e epidermais. Esse peptídeo é constituído de 53 resíduos de amino ácidos com três ligações dissulfetos (-S-S-) e é derivado, por clivagem, de um precursor que apresenta 1.168 resíduos de amino ácidos. O EGF tem um papel regulador potencial para a glândula lacrimal, mantendo a superfície e controlando o processo de cicatrização da córnea, bem como moléstias da superfície ocular [Wilson 1991; van Setten, Tervo et al., 1991]. Imunoglobulinas (Ig) são as moléculas centrais da resposta imune. Existem cinco classes de imunoglobulinas, a saber, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. A imunoglobulina A (IgA) é a principal classe de anticorpos das secreções externas, tais como saliva, lágrima, muco bronquial e muco intestinal. Logo, a IgA serve como a primeira linha de defesa do organismo. Na lágrima, a IgA é a imunoglobulina mais abundante, ligado ao componente secretor, e é sintetizada pelas células intersticiais [Franklin, Kenyon, Tomasi 1973; van Haeringen 1981]. Baseado em estudos que descreveram existir uma correlação entre o teor de glicose do sangue e o teor de glicose lacrimal, a lágrima tem sido usada para monitorar a

glicose no diabetes [Gasset, Braverman et al., 1968; Das, Sengupta et al., 1995; Lewis, Stephens 1958].

Um biossensor que utiliza duas enzimas foi idealizado para ser usado na detecção da glicose de lágrima e da saliva [Liu, Sheng et al., 2015]. As enzimas utilizadas foram a glicose oxidase e a DNAzima. Esta é uma DNA com capacidade de realizar funções catalíticas. Entre as várias DNAzimas, foi utilizada a “pistol-like DNAzyme (PLDZ) (DNA semelhante a revolver), que atua com cofatores metálicos bivalentes. Neste biossensor, a glicose oxidase oxida a glicose a ácido glicônico e H_2O_2 , num sinal primário. O PLDZ reconhece, por um sinal secundário, a H_2O_2 produzida e realiza a reação de autoclivagem na presença de cofatores Mn^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} . O monitoramento da glicose pode ser realizado pela clivagem de PLDZ.

Um sensor eletroquímico miniaturizado em forma de agulha e baseado em enzima, foi experimentado em coelhos para detectar glicose no fluido lacrimal. Três μL de lágrima são coletados num tubo capilar e o dispositivo com a glicose oxidase imobilizada num fio de platina é mergulhado na lágrima, detecta o H_2O_2 produzido na oxidação da glicose [Peng, Lu et al., 2013].

HEMOGLOBINA GLICADA

Embora, no capítulo anterior (cap. 6), tenhamos abordado aspectos de proteínas glicadas, acreditamos ser importante voltarmos ao assunto. Inicialmente, como o fizemos naquele capítulo, vamos fazer a distinção entre dois processos, a glicosilação e a glicação. A glicosilação refere-se ao processo de ligação de sacarídeos a proteínas, formando glicoproteínas, reação catalisada por enzimas, enquanto, glicação refere-se a ligação de sacarídeos as proteínas através de uma reação não enzimática [Lis, Shane 1993]. A glicosilação é um processo catalisada por enzimas da classe das transferases. Nas glicoproteínas, a ligação que ocorre entre o sacarídeo e o grupo amina do resíduo de cadeia lateral de proteína, é denominado ligação-N ou quando ocorre com o oxigênio (de serina e treonina) é denominado ligação-O. A fração de carboidrato da molécula glicoproteica pode constituir-se num sinal de reconhecimento capaz de direcionar as interações proteicas. A glicação, por sua vez é um processo não enzimático que ocorre espontaneamente entre o oxigênio do grupo aldeído do sacarídeo com o grupo amino N-terminal de uma proteína. A reação não enzimática entre a glicose, através de seu grupo carbonila com o grupo amino da glicina, foi descrita em 1912, por Maillard e por isso, a condensação entre um grupo carbonila com o grupo amino de resíduo de amino ácido recebeu o nome de reação de Maillard [[Huijberts, Schaper, Schalkwijk 2008; Rabbani, Thornalley 2012].

O sangue humano de adulto contém duas hemoglobinas principais, uma perfazendo cerca de 90-95% do total constituída por duas cadeias polipeptídicas, apresentando a mesma sequência de amino ácidos, chamadas cadeias alfas, e duas outras cadeias de mesma sequência entre si mas diferente das alfa, chamadas cadeias beta. Esta hemoglobina é referida como hemoglobina A (HbA). A outra hemoglobina do sangue humano de adulto é a hemoglobina A2, apresentando duas cadeias alfa e duas cadeias delta. A proteína constituinte da HbA é a globina, ligada covalentemente com o grupo prostético, a ferroprotoporfirina. É preciso ressaltar, que cada uma das cadeias polipeptídicas está ligada ao grupo prostético. Através de métodos cromatográficos a hemoglobina humana adulta (HbA) foi fracionada em HbA1a, HbA1b, e HbA1c [Allen, Schroeder, Balog 1958]. Em 1968, foi demonstrado que a HbA1c era uma glicoproteína [Brookchin, Gallop 1968]. Pesquisas bioquímicas mostraram que HbA1c era o resultado da reação de Maillard: numa primeira etapa o grupo amino da valina N-terminal da cadeia beta da hemoglobina reage com a glicose formando a aldimina (base de Schiff ou HbA1c lábil), que posteriormente sofre um rearranjo de Amadori formando uma cetoamina estável (HbA1c), ou reverte para a glicose

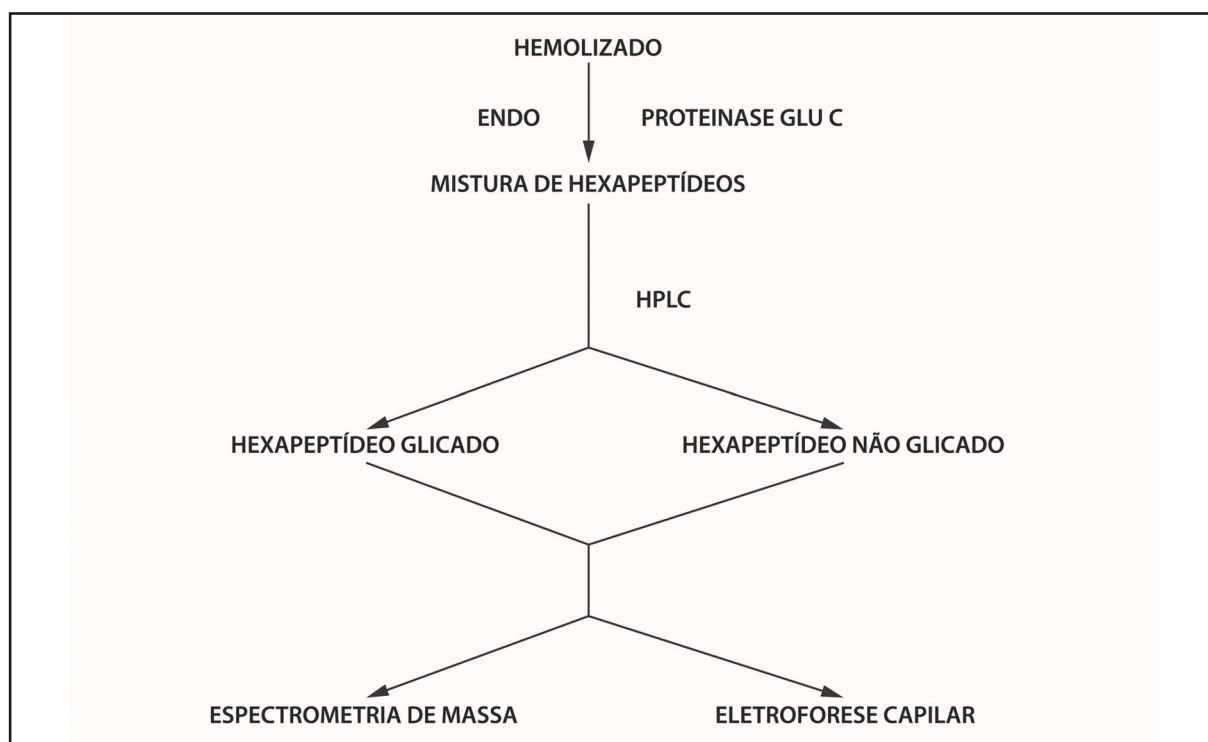
e a cadeia beta da hemoglobina [Bunn, Haney et al., 1976]. Esta reação não ocorre somente com a glicose e a valina N-terminal da cadeia beta. Todo grupo amino livre de resíduo, como por exemplo a lisina, também reage com a glicose, formando glicohemoglobinas. De todas as glicohemoglobinas, cerca de 60% é constituída por HbA1c [Shaklay, Garlick, Bunn 1984] (Figura 7.7).

Figura 7.7 - Formação da hemoglobina glicada como exemplo da reação de Maillard



Termos como glicohemoglobina, hemoglobina glicada, hemoglobina glicosilada, HbA1c ou teste A1c, referindo-se a procedimentos cromatográficos ou então GHb são usados para o produto da reação entre glicose e hemoglobina. De acordo com o IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) a fração da molécula da cadeia beta da hemoglobina que tem o aduto de glicose no amino ácido valina N-terminal pode ser expressa como: cadeia beta da hemoglobina-N-1-deoxifrutosil [Nordin, Dybkaer 2007]. Em outras palavras, HbA1c é uma substância-fração da cadeia beta da hemoglobina que tem um aduto hexose estável no amino ácido valina N-terminal, ou então β -N-1 deoxifrutosil hemoglobina. Esta definição elimina o aduto de glicose no amino ácido lisina das cadeias α e β da hemoglobina para a medida de HbA1c [Higgins 2012]. Os ensaios desenvolvidos para a medida da hemoglobina glicada se baseiam em métodos para separar as formas glicadas e não glicadas. A separação pode ser feita com base na diferença de carga, por cromatografia troca iônica (HPLC) ou então baseada na diferença de estrutura (cromatografia de afinidade). A determinação da hemoglobina glicada, segue o método de referência padrão, desenvolvido pelo “*International Federation of Clinical Chemistry- IFCC*” e é realizado em três etapas (Figura 7.8). Na primeira etapa, a hemoglobina de eritrócitos lavados e lisados, sofre uma clivagem proteolítica pela enzima endoproteínase Glu-C. Esta enzima atua liberando uma mistura de hexapeptídeos do N-terminal da cadeia peptídica da hemoglobina.

Figura 7.8 - Método de referência proposto pelo IFCC para determinação da hemoglobina glicada



Na segunda etapa, os hexapeptídeos glicosados e não glicosados são separados da mistura usualmente por cromatografia de alta performance (HPLC). Na terceira etapa, os hexapeptídeos glicosados e não glicosados, já separados, são quantificados por espectrometria de massa ou eletroforese capilar. A porcentagem de HbA1c é determinada pela relação entre o peptídeo glicosado e o peptídeo não glicosado da hemoglobina [Hoelzel, Weykamp et al. 2004]. Vejamos de forma resumida os métodos que são utilizados. HPLC, “*High Performance Liquid Chromatography*”: A cromatografia líquida de alta performance é um método de separação de moléculas baseado na carga elétrica, usando resina troca iônica. No HPLC, um solvente líquido contendo uma mistura de moléculas a serem identificadas, passa por uma coluna de resina troca iônica, firmemente empacotada de tal forma, que o líquido com a mistura de moléculas deve ser bombeado a alta pressão. A eletroforese capilar usa um tubo capilar de sílica fundida. O tubo é preenchido com o meio eletroforético, a amostra é injetada numa banda estreita do anodo (polo carregado positivamente). As moléculas são separadas pelas suas mobilidades em direção ao catodo (polo carregado negativamente). A espectrometria de massa é uma técnica analítica usada em química orgânica. Acoplada a técnica de dispersão de proteínas na fase gasosa, isto é, métodos conhecidos com MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) se tornou muito sensível capaz de analisar uma quantidade de biomoléculas da ordem de picomoles. Na técnica MALDI-espectrométrica, íons proteicos são gerados no tubo e se deslocam rapidamente num campo elétrico. Esse deslocamento é rápido chegando ao detector. Dessa forma o tempo de deslocamento TOF (*time-of-flight*) no campo elétrico é a medida da massa (ou melhor da relação massa/carga). A cromatografia de afinidade é um método baseado na capacidade de proteínas se ligarem a moléculas específicas, não covalentemente. Nesta técnica, a molécula conhecida como ligante, que liga a proteína de interesse, é ligada covalentemente a um material inerte e matriz porosa, numa coluna. A passagem pela coluna da mistura onde se encontra a proteína de interesse, possibilita a ligação dela com o ligante, enquanto as outras moléculas são lavadas saindo antes. A molécula que ficou presa na coluna é recuperada alterando as condições de eluição

Em 2008, foi realizado em Londres uma reunião para tratar de como expressar a HbA1c. Nessa reunião, com representantes da IDF (*International Diabetes Federation*), EASD (*European Society for the Study of Diabetes*) e ADA (*American Diabetes Association*), foi recomendado que o método de referência IFCC deve se tornar o método de referência global [*Report of ADA, EASD, IDF working group of the HbA1c assay.2004*]. O HbA1c expresso em porcentagem pode ter sua correspondência com a quantidade de glicose em mg/dL e mmol/L (Tabela 7.1). A determinação de HbA1c é grandemente aceita como uma medida do controle glicêmico, no entanto, não é recomendável que seja o único método de diagnóstico de diabetes. Qualquer condição que reduz a média de idade de eritrócitos reduz o HbA1c [Goldstein, Little et al., 1995]. Um teste que foi durante algum tempo considerado como teste de referência no diagnóstico de diabetes é o teste de tolerância a glicose oral OGTT (*Oral Glucose Tolerance Test*). Nesse teste o indivíduo ingere, em jejum, 75 g de glicose e o sangue retirado do dedo era analisado nos tempos zero, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Tabela 7.1 - Correspondência dos valores de HbA1c % com a glicose. Adaptado de Lai 2008

HbA1c	Glicose mg/dL	mmol/L
5,0	96,8	5,4
5,5	111,1	6,1
6,0	125,5	6,9
6,5	139,8	7,7
7,0	154,2	8,5
7,5	168,5	9,3
8,0	182,9	10,1
8,5	197,6	10,9
9,0	211,6	11,7

Os dados eram projetados num gráfico e a área sob a curva era determinada. A determinação da área sob a curva foi desenvolvida devido a variações na concentração de glicose entre indivíduos no jejum [Cheng, Li, Cheng 2018]. Atualmente é considerado apenas o valor obtido 2 horas após a carga de glicose.

Os três testes considerados para o diagnóstico de diabetes, isto é, a glicose plasmática em jejum, a OGTT, e o HbA1c apresentam vantagens e desvantagens [Bergman, Abdul-Ghani et al., 2020]. Assim, a glicose plasmática em jejum pode ser realizada com uma única retirada de sangue, no entanto, apresenta a desvantagem de requerer jejum noturno e é menos sensível do que o OGTT. O teste de tolerância a glicose oral inclui a determinação da glicose plasmática em jejum, bem como a determinação da glicose 2 horas após a carga do monossacarídeo; identifica mais indivíduos com disglícemia, do que somente a glicose plasmática em jejum e HbA1c. Contudo, apresenta a desvantagem de náuseas num subgrupo de pessoas: tem 2 horas de duração; pode variar com o dia do teste e a reprodutibilidade não é tão boa. O teste HbA1c reflete os níveis de glicose integrados nos 3 meses precedentes; não requer jejum; e é padronizado globalmente. Apresenta as desvantagens de ser menos sensível do que a glicose plasmática em jejum e o teste de tolerância a glicose oral; a interpretação e acurácia podem ser afetados pela presença de variantes de hemoglobina, deficiência de ferro, anemia. O teste de glicose plasmática em jejum reflete a homeostase da glicose no estado pós-absortivo, enquanto, o OGTT de 2 horas reflete primariamente a eliminação da carga de glicose exógena [De Fronzo, 2009]. Já o HbA1c correlaciona-se fortemente com a glicemia geral, uma vez que ela reflete a média de glicose de 2 a 3 meses. A comissão de especialistas da ADA introduziu em 1997 um novo termo, o IFG (Impaired Fasting Glucose =glicose em jejum alterado) para aqueles pacientes com glicemia em jejum intermediário entre os indivíduos normais e diabéticos (110-125 mg/dL ou 6,1 – 7,0 mmol/L) [Gillet 2009]. Em 1979, a NDDG havia criado o termo tolerância a glicose alterada, IGT (Impaired Glucose Tolerance), definido pela glicemia de 2 horas após a carga de glicose, os valores 140-190 mg/dL ou 7,8-11,1 mmol/L [National Diabetes Data Group 1979]. De modo geral o teste OGTT é aplicado naqueles indivíduos cuja glicemia em jejum apresenta valores de 110 -125 mg/dL. A determinação da glicose plasmática em jejum e o teste de tolerância a glicose oral, em 2 horas são recomendados para a triagem de pré-diabetes e diabetes [Nathan, Davidson et al., 2007]. Segundo especialistas, a interpretação dos resultados do teste OGTT em mmoles/L de glicose aponta para a classificação dos pacientes em normais, pré-diabéticos e diabéticos (tabela 7.2). Em 2002, foi publicado os procedimentos e recomendações para a análise laboratorial e controle do diabetes mellitus [Sacks, Bruns et al., 2002]. a glicose deve ser medida num laboratório autorizado para estabelecer o diagnóstico de diabetes e triagem de indivíduos de alto risco.

Tabela 7.2 - Interpretação do OGTT

Tipo	Glicose (mmol/L)	
	jejum	2 horas
NORMAL	< 6,0	≥ 7,8
PREDIABETES	6,1-6,9	7,8-11,0
DIABETES	≥ 7,0	≥ 11,0

A análise num laboratório autorizado não é recomendável para monitoramento de rotina. A glicose deve ser medida no plasma sanguíneo. Os medidores portáteis não devem ser usados para o diagnóstico de diabetes devido a imprecisão e variabilidade entre os medidores. O teste de tolerância a glicose oral não é recomendado para o diagnóstico de rotina de diabetes tipo 1 e 2. Essa matéria é controversa e a Organização Mundial da Saúde apoia o seu uso. A hemoglobina glicada deve ser medida pelo menos duas vezes ao ano em todos os pacientes com diabetes para documentar o controle glicêmico.

Para a ADA [*American Diabetes Association 2015*], os critérios para o diagnóstico de diabetes são os seguintes: (a) Hemoglobina glicada (HbA1c) ≥ 6,5%. O teste deve ser realizado num laboratório, através de um método certificado pelo NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) e padronizado ao ensaio DCCT (*Diabetes Control and Complications Trials*); (b) Glicose Plasmática de Jejum (FPG) ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L): O jejum é definido como a ingestão não calórica de pelo menos 8 horas; (c) 2 horas após carga de glicose ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) durante o OGTT. O teste deve ser realizado como descrito pela WHO (Organização Mundial da Saúde) usando carga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvido em água.

CLASSIFICAÇÃO DE DIABETES

Em 2014, a ADA, publicou o seguinte comentário sobre a classificação de diabetes: a designação de um tipo de diabetes a um indivíduo, frequentemente depende das circunstâncias presentes no tempo do diagnóstico, de modo que muitos indivíduos não se ajustam facilmente numa simples classe. Por exemplo, uma pessoa diagnosticada com diabetes mellitus gestacional pode continuar a ter hiperglicemia após o parto, podendo ter de fato diabetes do tipo 2. Alternativamente, uma pessoa que adquire diabetes em razão de grandes doses de esteroides exógenos, pode se tornar normoglicêmico, na descontinuação do uso dos glicocorticoides, porém, após episódios recorrentes de pancreatite, pode então desenvolver o diabetes. Outro exemplo é o indivíduo tratado com tiazidas, que anos mais tarde desenvolvem diabetes. Tendo-se em vista que as tiazidas raramente causam hiperglicemia severa, tais indivíduos provavelmente apresentam diabetes tipo 2, que é exacerbado pela droga. Portanto, para o clínico e para o paciente não importa o tipo de diagnóstico de diabetes, mas sim entender a patogênese da hiperglicemia e tratá-la efetivamente [*American Diabetes Association 2014*]. As tiazidas são compostos diuréticos, que atuam no transporte de Na⁺ e Cl⁻.

Segundo a ADA, *Japan Diabetes Society* e a *Canadian Diabetes Association*, a diabetes é classificada nas seguintes categorias: (i) Diabetes tipo 1: diabetes primariamente resultante da destruição das células beta pancreáticas, levando a deficiência absoluta de insulina. Esta forma

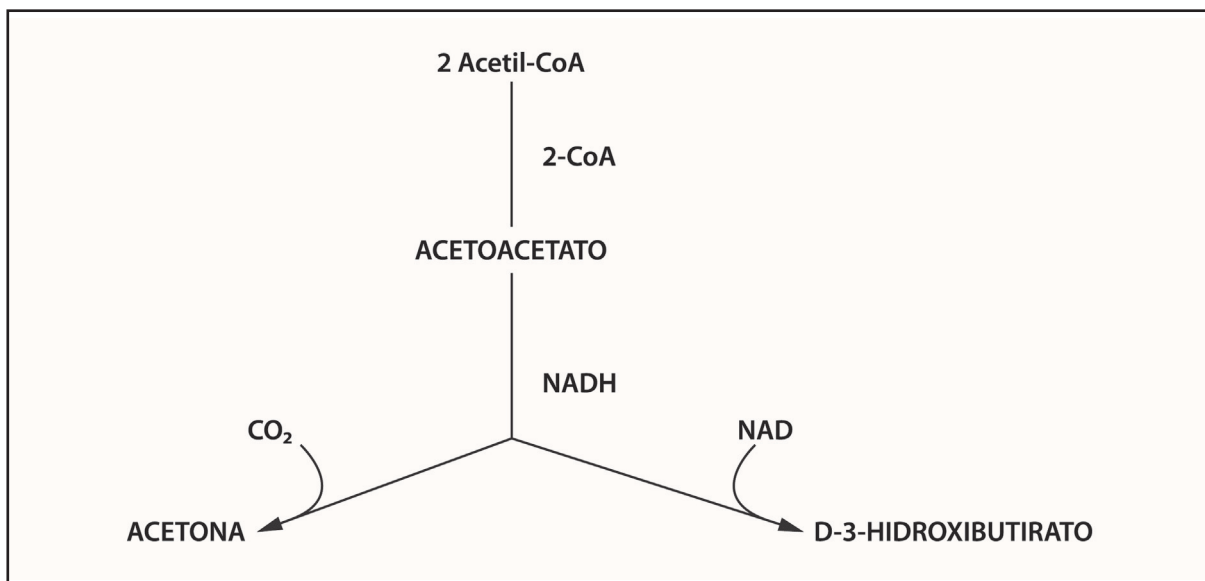
de diabetes inclui processo autoimune e os que a destruição das células beta é desconhecida; (II) diabetes tipo 2: diabetes devido a perda progressiva da secreção de insulina, podendo variar de uma forma predominantemente de resistência à insulina para um defeito predominantemente secretor de grande resistência à insulina, com graus variados na secreção de insulina; (III) Outros tipos específicos de diabetes, devido a outras causas, que inclui uma larga variedade de condições relativamente incomuns, primariamente forma de diabetes específicas geneticamente definidos; (IV) Diabetes Gestacional: diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gestação e que antes não estava claramente definido.

Diabetes do tipo 1 e do tipo 2 são moléstias heterogêneas em que a apresentação clínica e progressão da doença podem variar consideravelmente. A classificação é importante para o planejamento do tipo de terapia [American Diabetes Association 2019; Seino, Nanjo et al., 2010; Goldenberg, Punthakee 203].

DIABETES TIPO 1

Esta forma de diabetes era conhecida como diabetes insulino dependente ou diabetes juvenil e representa cerca de 5 a 10% do total de diabetes e resulta da destruição das células pancreáticas beta e mediado por autoimunidade [American Diabetes Association 2019]. A destruição das células beta acarreta a deficiência absoluta de insulina, na maior parte das vezes, transmitida imunologicamente [Petersmann, Muller-Wieland, Muller 2019]. A taxa de destruição das células beta pode ser rápida em alguns indivíduos (principalmente em infantes e crianças) e lenta em outros (principalmente adultos). Crianças e adolescentes podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença. A cetoacidose é caracterizada pela presença de ácido acetoacético, ácido D-3 hidroxibutírico e acetona, conhecidos como corpos cetônicos. Na realidade esses corpos cetônicos se acumulam, porque a acetil-coenzima A, que deveria se condensar com o oxaloacetato para formar o citrato no ciclo de Krebs, não o faz pela deficiência de oxaloacetato. Este, um componente do ciclo de Krebs, no jejum ou diabetes é direcionado para a formação de glicose, num processo chamado gliconeogênese. Dessa forma, a acetil-S-Co A reage entre si formando o ácido acetoacético que por sua vez forma o ácido D-3 hidroxibutírico e acetona. Em geral, a cetoacidose ocorre quando a oxidação de glicose é suprimida e o catabolismo de gordura é acelerada. A acetil-coenzima A, que dá origem ao ácido acetoacético é derivado da beta oxidação, principalmente, mas não exclusivamente de ácidos graxos saturados de número par de átomos de carbono. Os corpos cetônicos são moléculas solúveis, importantes fontes de energia para muitos tecidos. A produção de corpos cetônicos é fisiologicamente ajustada com a finalidade de manter as concentrações do ácido hidroxibutírico no intervalo de 0,05-0,1 mM. A cetogênese é induzida, fisiologicamente, por restrição calórica ou exercício prolongado resultando em acúmulo e elevação do nível circulante de hidroxibutirato até 5 mM [Laffel 1999; Saudbray, Marsac et al., 1981]. No diabético, apesar da hiperglicemia, o aumento dos níveis de corpos cetônicos se deve a produção pelo fígado para servir o cérebro, coração e músculo esquelético [Rheni, Dave 2018]. A D-3 hidroxibutirato é formado pela redução do acetoacetato, na matriz mitocondrial, numa reação catalisada pela D-3-hidroxi butirato desidrogenase. O principal local de formação de corpos cetônicos é o fígado, e uma vez formados eles se difundem para o sangue (Figura 7.10).

Figura 7.10 - Formação de corpos cetônicos



Em muitos casos autoanticorpos contra antígenos das ilhotas são verificados nas fases iniciais da doença. A destruição das células beta envolve mecanismos autoimunes e por isso são conhecidos como “diabetes mellitus tipo 1 autoimune”. Dependendo da forma pelo qual a diabetes se inicia e progride ela é classificada como fulminante, agudo e lentamente progressiva [Imagawa, Hanafusa et al., 2000]. Marcadores autoimunes incluem anticorpos para células das ilhotas e autoanticorpos para ácido glutâmico descarboxilase, GAD (*Glutamic Acid Decarboxylase*) GAD-65 (65 KDa), insulina, tirosinas fosfatases IA-2 e IA-b2 e ZnT8. Dessa forma, diabetes tipo 1 é definido pela presença de um ou mais destes marcadores autoimunes. A GAD ou glutamatodescarboxilase, catalisa a descarboxilação do ácido glutâmico para formar o ácido gama amino butírico (GABA), o qual funciona como inibidor de neurotransmissores. Duas formas diferentes de ácido glutâmico descarboxilase a GAD-65 e GAD-67 foram identificadas e descobertos serem codificados por diferentes genes [Erlander, Tillakaratne et al., 1991]. Ambas isoformas são sintetizadas no citoplasma como moléculas hidrofílicas solúveis. A GAD-65, mas não a GAD-67, é modificada pós-tradução e ancorada na membrana [Christgau, Aanstoot et al., 1992]. Tanto a Gad-65, quanto GAD-67, contém um sítio de ligação de fosfato de piridoxal, que atua como cofator na atividade da enzima [Jackson 1990]. Entre os vários autoantígenos das células beta identificados, GAD é um forte candidato para iniciar antígeno para T1DM. A presença de anticorpos anti GAD, juntamente com anti-IA-2 e anti-insulina são marcadores previsíveis confiáveis para o desenvolvimento de T1DM [Jun, Khil, Yoon 2002].

A glutamato descarboxilase é uma enzima que atua no glutamato produzindo o ácido gama amino butírico (GABA) tendo como cofator o fosfato de piridoxal. Proteínas tirosinas-fosfatases são enzimas de sinalização, envolvidas na regulação de numerosas funções celulares, entre as quais, o crescimento, a mitogênese, a motilidade, a interação célula-célula, o metabolismo, a transcrição gênica e respostas imunes [Burke, Zhang 1998]. A fosforilação de resíduos de tirosina é um processo que ativa ou atenua vias de sinalização, é reversível e dinâmico e o estado de fosforilação é o resultado das ações de duas enzimas, a quinase e a fosfatase. Vamos lembrar que o receptor de insulina é uma tirosina quinase, que quando ativada (formação do complexo insulina-receptor) se auto fosforila iniciando o processo de sinalização. A fosforilação é um processo em que o grupo gama fosforila do ATP é transferido para o grupo OH da tirosina. O processo é revertido pela ação de fosfatases, que catalisam a remoção hidrolítica do grupo fosforil ligado a proteína.

DIABETES TIPO IDIOPÁTICA

Existem formas de diabetes tipo 1 cuja etiologia é desconhecida. Pacientes com este tipo de doença apresentam insulinopenia permanente e são predispostos a cetoacidose, isto é formação de corpos cetônicos. São diabéticos que sofrem episódios de cetoacidose e exibem graus variados de deficiência de insulina entre episódios. Esta forma de diabetes é fortemente herdada, não é associada a HLA (*Human Leukocyte Antigen*) antígeno humanos de leucócitos, tendo um requisito para terapia de reposição de insulina [American Diabetes Association-2019].

DIABETES TIPO 2

Diabetes tipo 2 é o termo usado para aqueles indivíduos que apresentam resistência à insulina e geralmente com deficiência relativa de insulina. A maior parte dos pacientes com essa forma de diabetes são obesos, sendo que a própria obesidade é causadora de algum grau de resistência [Kolterman, Gray et al., 1981; Bogardus, Lillioja et al., 1985]. Entende-se por resistência à insulina, a reduzida capacidade da insulina de exercer seus efeitos sobre os tecidos alvos, como tecido adiposo, tecido muscular esquelético e fígado. Em termos de concentração de glicose no sangue, a resistência à insulina pode ser definida como uma situação, onde a concentração de insulina é inapropriadamente elevada para o nível de glicose no sangue [Borai, Livingstone, Ferns 2007]. A forma comum de resistência à insulina está associada a circunferência da cintura (adiposidade visceral), hipertensão, hiperglicemia e dislipidemia, envolvendo a redução do colesterol HDL e preponderância de lipoproteínas de baixa densidade [Greeve 2005; Lee, Choudhury 2007]. Componentes genéticos e ambientais estão associados a resistência à insulina. Variantes de dois genes, que codificam as proteínas das vias de sinalização da insulina tem sido implicados no substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), no fosfatidilinositol-3-quinase e também no receptor beta adrenérgico [Esposito, Li et al., 2003; Zhan, Ho 2005]. A sensibilidade à insulina pode ser acessada por meio de teste de tolerância, que foi descrito em 1929 [Horgaard, Thyssen 1929]. Esse método mede a glicose plasmática após injeção intravenosa de insulina, aos 15 e 5 minutos antes da injeção e 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 30 minutos após a injeção de insulina. Completando 30 minutos a glicose é injetada para evitar a queda contínua de glicose. A constante da taxa de desaparecimento da glicose é calculada após projeção dos dados num gráfico, como a inclinação da glicose sanguínea.

Outro método usado para quantificar a resistência à insulina é a avaliação do modelo homeostático, HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) [Matthews, Hosker et al., 1985]. Este método se baseia no princípio de que o grau de hiperglicemia em jejum é determinado pela combinação da deficiência das células beta e a resistência à insulina. Esse método sofreu alterações [Wallace, Levy, Matthews 2004]. O modelo HOMA nos dá uma estimativa da sensibilidade à insulina e a função das células beta, a partir das medidas em jejum da insulina plasmática e glicose sanguínea [Matthews, Hosker et al., 1985]. O método se baseia na medida da glicose e da insulina no estado basal, que é o reflexo do equilíbrio existente entre a produção hepática de glicose e a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, mantida por uma alça de feedback entre fígado e células beta [Turner, Holman et al., 1979]. Os dados usados neste modelo, vem de experimentos realizados em humanos e animais. O modelo original HOMA continha uma aproximação matemática simples de solução original não linear na equação interativa [Wallace, Levy, Matthews 2004]. usando as seguintes equações:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{FPI} \times \text{FPG}) / 22,5$$

$$\text{HOMA-\% B} + (20 \times \text{FPI}) / \text{FPG} - 3,5$$

Onde HOMA-IR é a resistência à insulina e HOMA-%B é a função das células beta; FPI é a concentração de insulina plasmática em jejum em mU/L e FPG é a concentração plasmática de glicose em jejum em mmol/L. Se a glicose medida é expressa em mg/dL, então o $HOMA-IR = FPG \times FPI / 405$ [Borai, Livingstone, Ferns 2007]. Hoje o modelo HOMA foi atualizado com o emprego do computador, corretamente resolvido com soluções não lineares. O modelo computacional pode ser usado para determinar a sensibilidade à insulina (% S) e função das células beta (% B), a partir de dados pareados das concentrações plasmáticas de glicose e insulina determinada pelo RIA (*Radio Immuno Assay*). Esse método muito usado para a determinação de hormônios, se utiliza de um anticorpo que liga especificamente o hormônio, e o hormônio marcado radioativamente. O princípio do método usa a competição do hormônio não marcado (amostra padrão) com hormônio marcado radioativamente para uma quantidade limitada de anticorpo. Constrói-se uma curva padrão, indicando quanto o hormônio marcado radioativamente liga o anticorpo como uma função do hormônio. Vamos lembrar, que a ação metabólica primária da insulina é de facilitar a captação pós-prandial da glicose, principalmente em três tecidos alvos: o tecido adiposo, o músculo esquelético e o fígado. No fígado há supressão da produção de glicose (gliconeogênese e glicogenólise), nos tecidos muscular e adiposo a captação de glicose e metabolismo. No diabético, o desenvolvimento da resistência à insulina é um processo fisiopatológico, em que, como visto acima, a supressão da produção de glicose no fígado é reduzida, enquanto, que o transporte de glicose via transportador GLUT-4 deixa de se verificar, tanto no músculo quanto no tecido adiposo [Jung, Choin 2014].

DIABETES GESTACIONAL

De acordo com a *German Diabetes Association* e a *German Association for Gynecology and Obstetrics*, a diabetes mellitus gestacional é definida como uma perturbação da tolerância a glicose, que é primeiro diagnosticada na gestação com o teste OGTT, sob condições padrão com medida de controle de qualidade da glicose plasmática venosa. Comumente a diabetes gestacional é descrita como uma desordem funcional marcada pelo aumento da resistência à insulina com declínio da compensação das células beta [Kleinwechter, Schafer-Graf et al., 2014].

Para a *Japan Diabetes Society*, diabetes gestacional é um estado de intolerância a glicose, que ocorre ou é detectada pela primeira vez durante a gestação. Etiologicamente, muitos pacientes com diabetes gestacional, provavelmente compartilham susceptibilidade genética comum com diabetes tipo 1 e tipo 2 [Seino, Nanjo et al., 2010].

Já para a *ADA*, diabetes gestacional é definida como qualquer grau de intolerância a glicose, reconhecido primeiro durante a gestação, sem levar em consideração se a condição pode ter ocorrido antes ou persistido após a gravidez. Esta definição facilitou a estratégia uniforme para a detecção e classificação da diabetes gestacional, porém é limitada pela imprecisão [American Diabetes Association 2019]. A hiperglicemia na mulher grávida pode ter consequências para o feto. Assim, a hiperglicemia materna pode levar a um aumento da secreção da insulina fetal e depositar glicogênio e gordura com macrosomia, maior circunferência abdominal fetal, e reduzido fator tensoativo pulmonar fetal. A necessidade de oxigênio pelo feto aumenta e o feto pode desenvolver poliglobulia [Kleinwechter, Schafer-Graf, Buhner 2014].

A deterioração da tolerância a glicose, normalmente ocorre da gestação e o critério proposto para avaliar [O'Sullivan, Mahan 1964], foram baseados nos dados obtidos de um estudo realizado com 752 mulheres grávidas. A tolerância a glicose anormal foi definida como dois ou mais valores de glicose em quatro, que foram maiores ou iguais a dois desvios padrão acima da média.

OUTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES

A classificação a seguir foi resumida de publicações da *American Diabetes Association*, *Japan Diabetes Society* e *German diabetes Association*

A-Defeitos Genéticos das Células Beta

Cromossomo 12-relativo a HNF-1 alfa

Cromossomo 7-relativo a glicoquinase

Outros

B- Defeitos Genéticos da Ação da Insulina

Resistência a insulina

Outros

C- Moléstias do Pâncreas Exócrino

Pancreatite

Fibrose Cística

Outros

D- Endocrinopatias

Acromegalia

Síndrome de Cushing

Outros

E- Indução por Drogas e Químicos

Ácido Nicotínico

Tiazidas

Outros

F- Infecções

Rubéola congênita

Citomegalovirus

Outros

G- Formas Incomuns de Diabetes Imuno-mediado

H- Outras Síndromes Genéticas.

Os efeitos monogenéticos das células beta no diabetes são caracterizadas pelo início da hiperglicemia, geralmente antes dos 25 anos. São referidos como MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), sendo caracterizada por uma secreção piorada da insulina. Outra forma está associada a mutações do cromossoma 12, no fator de transcrição hepática como o fator nuclear hepático (HNF-1 alfa). Mutação no cromossomo 7 resulta em defeitos na molécula

da enzima glicoquinase, que catalisa a conversão da glicose em glicose-6-fosfato. A enzima glicoquinase é considerada um sensor para as células beta pancreáticas. No defeito genético da ação da insulina, as anormalidades associadas com mutações no receptor de insulina variam da hiperinsulinemia a modesta hiperglicemia até diabetes severo. Na doença do pâncreas exócrino, processos adquiridos incluem, pancreatite, trauma, pancreatectomia. A fibrose cística e também a hemocromatose danificam as células beta e piora o processo de secreção de insulina.

Entre as endocrinopatias, vários hormônios como o hormônio do crescimento, cortisol, glucagon, epinefrina tem ações antagônicas as da insulina, de modo que, o excesso desses hormônios causa diabetes.

O tratamento com interferon pode desenvolver nos pacientes o diabetes associados com anticorpos das células beta e em certas circunstâncias severa deficiência de insulina [*American Diabetes Association 2008*].

DIABETES NEONATAL

O termo diabetes neonatal ou diabetes congênito refere-se ao diabetes que ocorre até os seis meses de idade, e 80-85% dos casos são de causas monogênicas [De Franco, Flanagan et al. 2015]. O diabetes neonatal pode ser transitório ou permanente. O transitório se deve na maioria dos casos a expressão excessiva de genes, enquanto o permanente se deve a mutação autossômicas de genes, relativo ao canal KATP.

BIBLIOGRAFIA GERAL

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (editores) Biochemistry. 5Th edition. W. H. Freeman and Company, New York 2002.

Devlin TM (editor) Textbook of Biochemistry, with Clinical Correlations. 7Th edition. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken NJ. 2011

Voet, Voet (editors) Biochemistry, 2th edition John Wiley & Sons, New York. 1995

Nicolau J (editor) Fundamentos de Bioquímica Oral. Guanabara-Koogan, RJ 2009

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Abel PU, von Woedtke T 2002. Biosensors for in vivo glucose measurement: can we cross the experimental stage. *Biosens Bioelectron* 17: 1059-70.

Abikshyei P, Ramesh V, Oza V 2012. Glucose concentration in the saliva secretion of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Obes Targets Ther* 5: 149-54.

Agrawal RP, Sharma N, Rathore MS et al.,2013. Noninvasive method for glucose level estimation by saliva. *J Diabetes Metab* 4: 1000266.

Allen DW, Schroeder WA, Balog J 1958. Observations on the chromatographic heterogeneity

of normal and fetal hemoglobin: a study of the effects of crystalization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J Am Chem Soc* 80: 1628-34.

Amer S, Yosuf M, Siddiqui PQ, Alam J 2001. Salivary glucose concentrations in patients with diabetes mellitus – A minimally invasive technique for monitoring blood glucose levels. *Pak J Pharm Sci* 14: 33-7.

American Diabetes Association 2008. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 31 (suppl 1): S 62-7.

American Diabetes Association 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 (suppl 1): S 81-90.

American Diabetes Association 2015. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 38 (suppl m1): S 8-16.

American Diabetes Association 2019. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care. *Diabetes Care* 42 (suppl 1): S 13-28.

Arakawa T, Kuroki Y, Nitta H et al., 2016. Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: a novel cavitas sensor. *Biosens Bioelectron* 84: 106-11.

Argueso P, Spurr-Michaud S, Russo CL, Tisdale A, Gipson IK 2003. MUC-16 mucin is expressed by the human ocular surface epithelia and carries the H 185 carbohydrate epitope. *Invest Ophthalmol Visc Sci* 44: 2487-95.

Arnold RR, Cole MF, McGhee JR 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197: 263-5.

Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, Ananthanaryan L 2009. Glucose oxidase- an overview. *Biotechnol Adv* 27: 489-501.

Batool R, Rhouati A, Nawaz MN, Hayat A, Marty JL 2019. A review of the construction of nanohybrids for electrochemical biosensing glucose. *Biosensors* 9: 46 ; doi 10.3390/bios9010046.

Bentley R, Neuberger A 1949. The mechanism of the action of notatin. *Biochem J* 45: 584-90.

Bergman M, Abdul-Ghani M, DeFronzo RA et al., 2020. Review of the methods for detecting glycemic disorders. *Diabetes Res Clin Pract* 165: 108233, doi 10.1016/j.diabres. 2020. 108233.

Biomarkers Definition Working Group 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual frame work. *Clin Pharmacol Ther* 69: 89-95.

Bogardus C, Lillioja S, Mott DM, Hollenbeck C, Reaven G 1985. Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man *Am J Physiol* 248: E 286-91.

Bollela P, Katz E 2020. Biosensors-recent advances and future challenges. *Sensors* 20, 6645 doi 10.3390.

- Borai A, Livingston C, Ferns GAA 2007. The biochemical assessment of insulin resistance. *Ann Clin Biochem* 44: 324-42.
- Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM et al., 2004. Functional aspects of the tear film layer. *Exp Eye Res* 78: 347-60.
- Brookchin RM, Gallop PM 1968. Structure of hemoglobin A1c: nature of the N-terminal beta chain blocking group. *Biochem Biophys Res Commun* 32: 86-93.
- Bun HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, Gallop PM 1976. The biosynthesis of human hemoglobin A1c. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *J Clin Invest* 57: 1652-9.
- Burke TR Jr, Zhang ZY 1998. Protein tyrosine phosphatase: structure, mechanism and inhibitor discovery. *Biopolymers (Peptide Science)* 47: 225-41.
- Burrin JM, Price CP 1985. Measurement of blood glucose. *Ann Clin Biochem* 22: 327-42.
- Campuzano S, Yanez-Sedeno P, Pingarron JM 2017. Electrochemical bioaffinity sensors for salivary biomarkers detection. *Trends Anal Chem* 86: 14-24.
- Cass AE, Davis G, Francis GD et al., 1984. Ferrocene mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal Chem* 56: 667-71.
- Chambers TP, Arulananda BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ 2000. Biosensors recognition elements. *Curr Issue Mol Biol* 10: 1-12.
- Cheng KC, Cheng JT 2018. The áreas under the curves (AUC) used in diabetes research: update view. *Integr Obesity Diabetes* 4: 1-2.
- Christgau S, Aanstoot HJ, Schierback H et al., 1992. Membrane anchoring of auto antigen GAD-65 to microvesicles in pancreatic beta cells by palmitoylation in the NH2-terminal domain. *J Cell Biol* 118: 309-20.
- Clark LC Jr 1956. Monitor and control blood and tissue oxygen tensions. *Trans Am Artif Intern Organs* 2: 41-8.
- Clark LC, Jr, Lyons C 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci* 102: 29-42.
- Clinical Practice guidelines. Definition, classification and diagnosis of diabetes, pre-diabetes and metabolic syndrome. Canadian Diabetes Association Clinical Practice guidelines. Expert Committee 2013. *Canadian J Diabetes* 37: S 8-11.
- Cryer PE 1981. Glucose counterregulation in man. *Diabetes* 30: 261-4.
- Das BN, Sengupta S, Das BK, Goswami NR 1995. Tear glucose estimation an alternative to blood estimation. *J Indian Med Assoc* 93: 127-8.
- Deeg R, Kraemer W, Ziegenhorn J 1980. Kinetic determination of serum glucose by use of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase method. *J Clin Chem Clin Biochem* 18: 49-52.

De Franco E, Flanagan SE, Houghton JAL et al., 2015. The effect of early comprehensive genomic testing on clinical care in neonatal diabetes: an international cohort study. *Lancet* 386: 957-63.

DeFronzo RA 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58: 773-95.

Du Y, Zhang W, Wang ML 2016. An on-chip disposable salivary glucose sensor for diabetes control. *J Diabetes Sci Technol* 10: 1344-52.

Dubowski KM 1962. An O-toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clin Chem* 8: 215-35.

Dubowski KM. 2008. An O-tolidine method for body-fluid glucose determination. *Clin Chem* 54: 1919-20.

Erlander MG, Tillakaratne NJK, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ 1991. Two genes encodes distinct glutamate decarboxylase. *Neuron* 7: 91-100.

Esposito DL, Li Y, Vanni C et al., 2003. A novel T609R missense mutation insulin receptor substrate-1 identified in a subject with type 2 diabetes impairs metabolic insulin signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1468-75.

Farris RL, 1985. Tear analysis in contact lens wearers. *Trans Am Ophthalmol* 83: 501-45.

Fenzl A, Nayak P, Hirsch T et al., 2017. Laser-scribed graphene electrodes for aptamer-based biosensing. *ACS Sensors* 2:616-20.,

Fingerhut B, Ferzola R, Marsh WM 1963. Application of a ferrocyanide phosphomolibdate reaction to an automated determination of serum glucose. *Clin Chim Acta* 8: 953-9.

Franklin RM, Kenyon KR, Tomasi TB 1973. Immunohistologic studies of human lacrimal gland: localization of immunoglobulins, secretory component and lactoferrin. *J Immunol* 10: 984-92.

Freire RS, Pessoa CA, Mello LD, Kubota L 2003. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *J Braz Chem Soc* 14: 230-43.

Gasset AR, Braverman LE, Fleming MC et al., 1968. Tear glucose detection of hyperglycemia. *Am J Ophtalmol* 65: 414-20.

Ghindilis AL, Atanasov P, Wilkins E 1997. Enzyme catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical application. *Electroanalysis* 9: 661-74.

Gillet MJ 2009. International Expert Committee report on the role of A1c assay in diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 32: 1327-34.

Goldenberg R, Pinthakee Z 2013. Definition, classification and diagnosis of diabetes, pre-diabetes and metabolic syndrome. Canadian Diabetes Association clinical practice guidelines expert committee. *Canadian J Diabetes* 37: s 8-11.

Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA et al., 1995. Tests of glycemia in diabetes. Technical review. *Diabetes Care* 18: 896-909.

Gorton L, Lindgren A, Larsson T et al., 1999. Direct electron transfers between heme containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Anal Chem Acta* 400; 91-108.

Gorton L, Dominguez E 2002. Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H a mediator modified electrode. *Rev Mol Biotechnol* 82: 371-92.

Greeve J 2005. Inhibition of the synthesis of apolipoprotein B containing lipoproteins. *Handb Exp Pharmacol* 170: 483-517.

Gug IT, Tertis M, Hosu O, Cristea C 2019. Salivary biomarkers detection: analytical and immunological methods overview. *Trends Anal Chem* 113: 301-16.

Guibault GG, Lubrano GJ 1973. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal Chim Acta* 64: 439-55.

Gupta S, Nayak MT, Sunitha JD et al., 2017. Correlation of saliva glucose level with blood level in diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Pathol* 21: 334-9.

Gutteridge JM, Paterson SK, Segal AW, Halliwell B 1981. Inhibition of lipid peroxidation by iron binding protein lactoferrin. *Biochem J* 199: 259-61.

Hagedorn HC, Jensen BN 1923. Microdetermination of blood sugar with ferricyanide. *Biochem Z* 135: 46-58.

Hatzinikolaou DG, Hansen OC, Macris BJ et al., 1996. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger* characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 371-81.

Hegde A, Shenoy R, D'Mello P et al., 2010. Alternative markers of glycemic status in diabetic mellitus. *Biomed Res* 21: 252-6.

Heller A 1990. Electrical wiring of redox enzymes. *Acc Chem Res* 23: 128-34.

Heller A 1992. Electrical connection of enzyme redox centers to electrode. *J Phys Chem* 96: 3579-87.

Higgins T 2012. HbA1c an analyte of increasing importance. *Clin Chem* 45: 1038-45

Hiratsuka A, Fujisawa K, Muguruma H 2008. Amperometric biosensor based on glucose dehydrogenase and plasma-polymerized thin films. *Anal Sci* 24: 483-6.

Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO et al., 2004. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan and Sweden. A method-comparison study. *Clin Chem* 50: 166-74.

Horgaard A, Thayssen TEH 1929. Clinical investigation into the effect of intravenous injection of insulin. *Acta Med Scand* 72: 92-5.

Huijberts MSOP, Schaper NC, Schalkwijk CG 2008. Advanced glycation endproducts and diabetes disease. *Diabetes Metab Res Rev* 24 (suppl 1): S 19-24.

Huisman TH, Martis EA, Dozy A 1958. Chromatography of hemoglobin types on carboxymethylcellulose. *J Lab Clin Med* 52: 312-27.

Hultman E 1959. Rapid specific for the determination of aldosesaccharides in blood. *Nature* 183 108-9.

Ilea A, Andrei V, Feurdea CN et al., 2019. Saliva a magic biofluid available for multilevel assessment and mirror of general health. A systematic review. *Biosensors* 9: 27 doi 10-.3390.

Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J et al., 2000. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by rapid onset and absence of diabetes related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 342: 301-7.

Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS et al., 1996. Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1684-92.

Iqbal SS, Mayo MW, Bruno JG et al., 2000. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosens Bioelectron* 15: 549-78.

Jackson FR 1990. Prokaryotic and eukaryotic pyridoxal dependent decarboxylases are homologous. *J Mol Evol* 31: 325-9.

Jaisson S, Leroy N, Meurice J, Guillard E, Gillery P 2012. First evaluation of capillary 2 flex piercing (sebja) as a new analyzer for HbA1c assay by capillary electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 50:1769-75.

James P, McCulley JP, Ward E, Shine WE 2003. Meibomian gland function and tear lipid layer. *Ocular Surf* 1: 97-106.

Juarez T, Biener J, Weissmuller J, Hodge AM 2017. Nanoporous metals with structural hierarchy: a review. *Adv Eng Mater* 19: 1700389.

Jumblatt MM, McKenzie RW, Steele OS, Jumblatt JE 2003. MUC-7 expression in the human lacrimal gland and conjunctiva. *Cornea* 22: 41-5.

Jun HSJ, Khil LY, Yoon JW 2002. Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Cell Mol Life Sci* 59: 1892-901.

Jung UJ, Choi MS 2014. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and non alcoholic fat liver disease. *J Mol Sci* 15: 6184-223].

Jurysta C, Bulur N, Oguizhan B et al., 2009. Salivary glucose concentration and excretion in normal and diabetic subjects. *J Biomed Biotechnol* 2009 article 430426 doi 10. 1155.

Kalcher K 2017. Renaissance and current trends with electrochemical sensors. *Int J Biosens Bioelectron* 3: 00083.

- Karyakin AA, Gitelmacher OV, Karyakina EE 1995. Prussian-blue based first Generation biosensor a sensitive amperometric electrode for glucose. *Anal Chem* 67: 2419-23.
- Kerner W, Bruckel J 2014. Definition, Classification and Diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122: 384-6.
- Kidby DK, Davidson DJ 1973. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal Biochem* 55: 321-5.
- Kim J, Campbell AS, de Avila BE, Wang J 2019. Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nat Biotechnol* 37: 389-406.
- King-Smith PE, Fink BA, Hill RM et al., 2004. The thickness of the tear film. *Curr Eye Res* 29: 357-68.
- Kleinwechter H, Schafer-Graf U, Buhrer C et al., 2014. Gestational diabetes mellitus (GDM) diagnosis, therapy and follow-up care. Practice guideline of the German Diabetes Association (DDG) and German Association for Gynecology and Obstetrics (DGGG). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122: 395-405].
- Kolterman OG, Gray RS, Griffin J et al., 1981. Receptor and post receptor defects contribute to insulin resistance in non insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 68: 957-69.
- Laffel I 1999. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 412-26.
- Lee JM, Choudhury RP 2007. Prospects for atherosclerosis regression: HDL elevation and other emerging therapeutic Technologies. *Heart* 93: 559-64.
- Lewis JG, Stephens PJ 1958. Tear glucose in diabetes. *Br J Ophthalmol* 42:754-8.
- Li N, Wang N, Zheng J et al., 2005. Characterization of human tear proteome using multiple proteomic analysis technique. *J Proteome Res* 4: 2052-61
- Liao C, Mak C, Zhang M et al., 2015. Flexible organic electrochemical transistor for highly selective enzyme biosensor and used saliva testing. *Adv Mater* 27: 676-81.
- Lis, H, Shanon N 1993. Protein glycosylation- structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218: 1-27.
- Liu C, Sheng Y, Sun Y et al., 2015. A glucose oxidase coupled DNAzyme sensor for glucose detection in tears and saliva. *Biosens Bioelectron* 70:455-61
- Loo JFC, Ho AHP, Turner APF, Mak WC 2019. Integrated printed microfluidics biosensors. *Trends Biotechnol* 37: 1104-20.
- Magner Jr LC, 1998. Trends in elctrochemical biosensors. *Analyst* 123:1967-70.
- Malon RSP, Sadir S, Balakrishnan M, Corcoles EP 2014. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics. *Biomed Res Intern*. Article 962903/doi 10.1155.

- Manjrekar PA, Hegde A, Shrilaxmi et al., 2012. Fructosamine in non diabetic first degree relatives of type 2 diabetes patients. Risk assessor. *J Clin Diagnostic Res* 6: 770-7.
- Mascarenhas P, Fatela B, Barhona I 2014. Effect of diabetes mellitus type2 on salivary glucose-A systematic review and meta analysis of observational studies. *PLoS one* 9: e 101706 doi 10.1371.
- Mateles RI 1960. Ferricyanide reduction method for reducing sugar. *Nature* 187: 241-2.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS et al., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 28: 412-9.
- McKenzie RW, Jumblatt JE, Jumblatt MM 2004. Quantification of MUC-2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 703-8.
- Mieling GE, Pardue HL, Thompson JE, Smith RA 1979. A kinetic method for glucose that is insensitive to variations in temperature and enzyme activity. *Clin Chem* 25: 1581-90.
- Mishima S, Gasset A, Klyce SD Jr, Baum JL 1966. Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmol* 5: 264-6.
- Mitsumori M, Yamaguchi M, Kano Y 1998. New approach to noninvasive measurement of blood glucose using saliva analyzing system. *Eng Med Biol Soc* 20: 1767-70.
- Murugaiyan SB, Ramasamy R, Gopal N, Kuzhandaivelu V 2014. Biosensors in clinical chemistry an overview. *Adv Biomed Res* 3: 67.
- Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA et al., 2007. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care* 30: 753-9.
- National Diabetes Data Group 1979. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28: 1039-57.
- Newman J, White S, Tothill I, Turner APF 1995. Catalytic material membranes and fabrication processes suitable for the construction of amperometric biosensors. *Anal Chem* 67: 4594-9.
- Newman JD, Turner APF 2005. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosens Bioelectron* 20: 2435-53.
- Nordin G, Dybkaer R 2007. Recommendation for term and measurement unit for HbA1c. *Clin Chem Lab Med* 45: 1081-2.
- Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV et al., 2004. Electric field effect in atomically thin films. *Science* 306: 666-9.
- Nyvarinen A, Nikkila EA 1962. Specific determination of blood glucose with O-toluidine. *Clin Chim Acta* 7: 140-3.
- Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K 2006. Laboratory finding in tears fluid analysis. *Clin Chim Acta* 369: 17-28.

- O'Sullivan JB, Mahan CM 1964. Criteria for the oral glucose test in pregnancy. *Diabetes* 13: 278-85.
- Pappa AM, Curto VF, Braendlein M et al., 2016. Organic transistor arrays integrated with finger powered microfluidics for multianalyte saliva testing. *Adv Healthc Mater* 5: 2295-302.
- Passey RB, Gillum RL, Fuller JB et al., 1977. Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in Proposed Product Class Standard (1974). *Clin Chem* 23: 131-9.
- Peng b, Lu J, Balijepalli AS et al., 2013. Evaluation of enzyme-based tear glucose electrochemical sensors over a wide range of blood glucose concentrations. *Biosens Bioelectron* 49: 204-9.
- Petersmann A, Muller-Wieland D, Muller UA et al., 2019. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin endocrinol Diabetes* 127 (suppl 1): S 1-7.
- Pischko MV, Katakis I, Lindquist SE et al., 1990. A direct electrical communication between graphite-electrode and surface absorbed glucose oxidase redox polymer complexes. *Angew Chem Int Edit* 29: 82-9.
- Pluschkell S, Hellmuth K, Rinas U 1996. Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioenz* 51: 215-20.
- Rabbani N, Thornaley PJ 2012. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids* 42: 1087-96.
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. *Diabetes Care* 20: 1183-97.
- Report of the Committee on the Classification and Diagnostic criteria of diabetes mellitus. 2002. *Diabetes Res Clin Pract* 55: 65-85.
- Report of ADA, EASD, IDF working group of the HbA1c assay. *Diabetologia* 2004, 47: R 23-4.
- Rheni AK, Dave KR 2018. Impact of hypoglycemia on brain metabolism during diabetes. *Mol Neurobiol* 55: 9075-088.
- Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR 2010, Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev* 39: 1747-63.
- Sacks DB, Brun DE, Goldstein DE et al., 2002. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 48: 436-72.
- Saudbray JM, Marsac C, Limal JM et al., 1981. Variation in plasma ketone bodies during 24 hours fasting in normal and hypoglycemic children: relationship to age. *J Pediatr* 98: 904-9.
- Scheller FW, Schubert F, Newman B et al., 1991. Second Generation biosensors. *Biosens Bioelectron* 6: 245-53.
- Scherz W, Doane MG, Dohlman CH 1974. Tear volume in normal eyes and keratoconjunctivitis sica. *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol* 192: 141-50.

Seino Y, Nanjo K, Tajima N et al., 2010. Report of committee on the classification and diagnosis criteria of diabetes mellitus. *J Diabetes Invest* 1: 212-28.

Shaklay N, Garlick RL, Bunn HF 1984. Nonenzymatic glycosylation of human albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 259: 3812-7.

Soni A, Jha SK 2017. Smartphone based noninvasive salivary glucose biosensor. *Anal Chim Acta* 996: 54-63.

Standards of the Medical Care in Diabetes-2014. 2014 *Diabetes Care* 37 (suppl 1): S 14-80.

Strimbu K, Tavel JÁ 2010. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5: 463-6.

Thenevot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS 2001. Technical Report. Electrochemical biosensors: recommended definition and classification. *Biosens Bioelectron* 16: 121-31.

Tiffany JM 1987. The lipid secretion of the meibomian glands. *Adv Lipid Res* 22: 1-62.

Turner AP, Piletsky AS 1999. In vitro diagnostics in diabetes. Meeting the challenge. *Clin Chem* 45; 1596-601.

Turner AP 2000. Biosensors-sense and sensitivity. *Science* 290: 1315-7.

Turner RC, Holman RR, Mathews D et al., 1979. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism* 28: 1086-96.

Updike SJ, Hicks GP 1967. The enzyme electrode. *Nature* 214: 986-8.

2 diabetic patients. *J Oral Sci* 52: 293-8.

Van Haeringen NJ 1981. Clinical biochemistry of tears. *Surv Ophthalmol* 26: 84-96.

Van Setten GB, Tervo T, Viinikka K et al., 1991. Ocular disease leads to decreased concentration of epidermal growth factor in the tears fluid. *Curr Eye Res* 10: 523-7.

Wallace TM, Levy JC, Matthews DR 2004. Use and abuse of HOMA modelling. *Diabetes Care* 27> 1487-95.

Wang J 2008. Electrochemical glucose biosensors. *Chem Rev* 108: 814-25.

Will T, Tjalling WF, Thonnessen A, van Bel AJ 2007. Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proc Nat Acad Sci USA* 104: 10536-41.

Wilson SE 1991. Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface. *Am J Ophthalmol* 111: 763-5.

World Health Organization Expert Committee on Diabetes Mellitus. *Second WHO Technical Report series* 727 1965. Geneva, Switzerland.

Wu Y, Hu NF 2007. Biosensors based on direct electrontransfer in redox proteins. *Microchim Acta* 159: 1-17

Xiong C, Zhang T, Kong W et al., 2018. ZIF-67 derived porous. Co₃O₄ hollow nanopolyhedron functionalized solution gated graphene transistors for simultaneous detection of glucose and uric acid in tears. *Biosens Bioelectron* 101: 21-8.

Yamashita M, Watanabe F 1973. Determination of serum glucose with O-toluidine without glacial acetic acid. *Clin Chim Acta* 47: 211-4.

Yamaguchi M, Mitsumori M, Kano Y 1998. Noninvasively measuring blood glucose using saliva. *Eng Med Biol* 17: 59-63.

Yoo EH, Lee SY 2010. Glucose biosensor-an overview of use in clinical practice. *Sensors* 10:4558-76.

Zhan S, Ho SC 2005. Metaanalysis of the association of Trp64Arg polymorphism in the beta 3 adrenergic receptor with insulin resistance. *Obes Res* 13: 1709-19.

Zhang A, Sun H Wang X 2013. Salivary proteomics in biomedicine research. *Clin Chim Acta* 415: 261-5.

Zhang W, Du Y, Wang ML 2015. Nonivasive monitoring using saliva biosensor. *Sens Biosens Res* 4:23-9.

Zhao M, Leung OS 2020. Revisiting the use of biological fluids for noninvasive glucose detection. *Future Med Chem* 12: 645-7.

Zhu Z, Garcia-Gancedo L, Flewitt A et al., 2012. A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene. *Sensors* 12: 5996-6022.

CAPÍTULO 8-TRANSPORTADORES DE GLICOSE

Os organismos vivos são constituídos de compostos de carbono. A Química Orgânica é a parte da Química, que estuda os compostos de carbono e seus derivados. Os compostos de carbono formam as chamadas biomoléculas dos organismos vivos. As reações das biomoléculas podem ser descritas pelos métodos usados em Química Orgânica, que classifica os compostos de acordo com os grupos funcionais. Entre os grupos funcionais de importância na Bioquímica podemos citar alguns: grupo hidroxila (-OH) de álcoois, grupo carboxílico (-COOH) de ácidos carboxílicos, grupo amina (-NH₂) de aminas, grupo sulfidril (-SH) de tióis, grupo carbonila (-CO-) de aldeídos e cetonas e outros.

Como já vimos anteriormente, a glicose é um composto orgânico apresentando um grupo funcional carbonila e grupos funcionais hidroxilas. A glicose é o principal substrato anabólico e catabólico do organismo. Anabolismo refere-se a um conjunto de processos de síntese de biomoléculas a partir de compostos simples, enquanto o catabolismo representa o conjunto de processos de degradação de nutrientes para o fornecimento de energia. Para melhor entendermos esse aspecto, vamos conceituar metabolismo. Chamamos de metabolismo a uma série de reações químicas, que ocorrem nos organismos vivos, que se inicia a partir de uma determinada molécula, que é convertida a outras moléculas. As vias metabólicas são divididas em duas classes: (1) aquelas vias que convertem energia em formas biológicas que podem ser utilizadas e (2) aquelas vias que requerem energia. As reações químicas que transformam compostos liberando energia celular são chamadas reações catabólicas ou catabolismo, enquanto as reações que requerem energia são chamadas reações anabólicas ou anabolismo. Todos os componentes celulares estão em equilíbrio dinâmico, isto é, os processos de síntese e de degradação criam um estado dinâmico das concentrações das substâncias, de modo que as vias anabólicas e catabólicas são reguladas para manter o equilíbrio apropriado de intermediários e produtos químicos. Para que a molécula seja aproveitada pela célula, precisa entrar na mesma, vencendo a barreira da membrana plasmática, uma estrutura semipermeável, responsável pela entrada e saída de moléculas. Entende-se por transporte de membrana o movimento de moléculas através de membranas. O transporte pode envolver a passagem de solutos em direção ao citoplasma (importação), o movimento de moléculas de dentro da célula para fora (exportação) e transporte transcelular. O transporte pode ser passivo ou ativo. O transporte passivo descreve a passagem de moléculas por meio de um gradiente de concentração. É um transporte unidirecional e se processa até que um equilíbrio entre as concentrações, fora e dentro da célula sejam estabelecidas. Isto é o resultado a ser obtido, se o transporte ocorrer por simples difusão, contudo quando o transporte é intermediado por uma proteína de transporte, o equilíbrio é alcançado mais rapidamente. Quando o transporte passivo é intermediado por proteína, o processo é denominado difusão facilitada [Cura, Carruthers 2013]. A difusão facilitada da glicose, de uma concentração alta para uma concentração baixa, ocorre de forma facilitada por transportadores, canais ou poros da membrana plasmática. Já o transporte ativo é definido como o movimento de uma molécula contra um gradiente de concentração. É um processo guiado por energia, em que as proteínas de membrana transportam moléculas através das células, que podem ser classificadas em primária ou secundária. A bomba sódio-potássio-ATPase (Na⁺ K⁺ ATPase) é um exemplo de transporte ativo primário, em que a hidrólise de ATP fornece a energia para o transporte de sódio para fora da célula e de potássio para o interior da célula. A bomba é chamada Na⁺ K⁺ ATPase, porque a hidrólise do ATP só ocorre, quando o sódio e o potássio são ligados na bomba. O secundário usa gradientes para transportar outras moléculas [Geck, Hienz 1989; Neverisky, Abbot 2015].

O transporte passivo é subdividido em duas categorias: difusão simples e difusão facilitada. Para que o transporte possa ser realizado, o transportador precisa primeiro reconhecer a molécula específica a ser transportada. O transporte de glicose requer duas etapas: na primeira etapa a

glicose, que é reconhecida pelo transportador, se liga a superfície do transportador, e na segunda etapa o transportador sofrendo uma alteração conformacional possibilita o movimento da glicose através da membrana plasmática, em direção ao citoplasma [Bogan 2012]. O transportador fica inserido entre dois estados e a glicose se associa sequencialmente com vários sítios do canal do transportador [Naftalin 2010]. Portanto, para que a glicose passe do ambiente externo para o interno da célula, precisa ser reconhecida pelo seu transportador, ligar ao transportador, movimentar-se através da membrana plasmática, ser liberada para que o transportador retorne a sua conformação original. A cinética do transporte pode ser avaliada como uma catálise enzimática, em que o transportador demonstra saturação pelo substrato, velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten (K_m). Como já vimos anteriormente, o K_m representa a concentração do substrato, em que a velocidade da reação é metade da velocidade máxima (V_{max}). O K_m é uma importante característica da reação e é significativa para a função biológica.

Os primeiros indícios de que a glicose entra na célula via transporte intermediado ou facilitado surgiu em 1948 quando, LeFevre, estudando a penetração de glicose em eritrócitos humanos observou, que a taxa de penetração era reduzida com o aumento da concentração de glicose e era inibida por metais como mercúrio (Hg^{2+}) [LeFevre 1948]. Em outra publicação, os achados encontrados por LeFevre foram explicados pela existência de um mecanismo transportador, envolvendo a combinação de glicose com componentes da membrana plasmática durante a passagem de glicose [LeFevre, LeFevre 1952]. A bicamada lipídica, da membrana plasmática, por ser de natureza lipídica é impermeável para a glicose. Dessa forma, o transporte de glicose através da membrana plasmática, ocorre por mediação via transportadores de glicose.

Os genes SLC-2 A de mamíferos constituem uma grande superfamília cujos produtos proteicos estão envolvidos no transporte de uma variedade de hexoses e outros compostos de carbono. As proteínas codificadas pelo gene SLC-2A são transportadores facilitados de hexoses e receberam o nome de GLUT (*Glucose Transporter*). Estudos mostraram, que a proteína revela uma estrutura que contém 12 α -hélices transmembrana, que combinam para formar um canal de membrana central aquoso para o transporte de substrato. [Mueckler, Makepeace 2006; Deng, Xu et al., 2014]. Esses transportadores GLUTs mostram forte especificidade para D-estereoisômeros de pentoses e hexoses que adotam a configuração de cadeira do anel piranosídico [Barnett, Holman et al., 1975]. Embora a forma piranosídica seja representada num mesmo plano, os ângulos das valências dos átomos de carbono e do oxigênio não permitem que se coloquem num mesmo plano. Dessa forma, elas são representadas nas configurações de cadeira e de bote. A conformação de cadeira é a mais estável, portanto é a predominante.

A difusão facilitada é diferente do transporte intermediado pelos transportadores de açúcar ativos, isto é, os co-transportadores ligados a sódio/glicose que exploram a energia livre disponível no gradiente transmembrana de cátion [Wright, Turk 2004]. Em humanos foram identificados 14 membros da família de transportadores de glicose (GLUT). As proteínas GLUTs apresentam características estruturais comuns: são constituídas por 12 domínios alfa hélices transmembrana, os grupos N-terminal e C-terminal localizados no lado citoplasmático, um domínio extracelular altamente glicosilado e uma grande alça entre os domínios 6 e 7 [Szablewski, 2017]. Todos os domínios helicoidais hidrofóbicos são ligados entre si, por alças hidrofílicas de vários tamanhos [Joost, Thorens 2001; Uldry, Thorens 2004]. De acordo com a similaridade sequencial e a posição do sítio de glicosilação, a família GLUT pode ser classificada em 3 subclasses [Thorens, Mueckler 2010; Augustin 2010; Sandoval-Muniz, Vargas-Guerrero et al., 2016]: Classe I- Glut-1-4, Glut 14; Classe II-Glut-5, 7, 9, 11; Classe III- Glut-6, 8, 10, e (o transportador de mioinositol impulsionado por prótons) HMIT ou GLUT 13 [Augustin 2010].

As classes I e II de GLUTs têm seus sítios de glicosilação na primeira alça extracelular, entre as hélices transmembranas 1 e 2. Na classe III o sítio de glicosilação localiza-se na alça 9.

As sequências proteicas dos GLUTs possuem homologia de 14 a 63%. Os membros da classe I, são caracterizados em termos de estrutura, função e distribuição celular: o GLUT-1 é expresso particularmente no cérebro e eritrócitos; o GLUT-2 é expresso primariamente nas células beta do pâncreas, fígado e rins; o GLUT-3 apresenta alta afinidade a glicose, e isto é consistente com a sua presença nos tecidos, onde a demanda de glicose é considerável, em particular o cérebro; o GLUT-4 é encontrado no coração, músculo esquelético e tecido adiposo, onde é responsável pela redução da glicose plasmática pós-prandial, sendo também encontrada no cérebro [Rayner, Thomas, Trayhurn 1994; Wood, Trayhurn 2003]. Estimulado pela insulina o GLUT-4 presente em vesículas é deslocado para a membrana plasmática favorecendo o aumento do transporte de glicose [Bryant, Govers, James 2002; Shepherd, Kahn 1999]. O GLUT-14 parece ser uma duplicação do gene do GLUT-3, apresentando uma identidade sequencial de 93%, do GLUT-3. Ao contrário do GLUT-3, o GLUT-14 só é expresso no testículo e pressupõe-se, que seja um transportador de glicose e do ácido dehidroascórbico [Wu, Freeze 2002]. O GLUT-5, um transportador de frutose, é expresso predominantemente no intestino, testículo e rins. O GLUT-11 não é expresso nem no coração e nem no músculo esquelético, porém é detectado no fígado, pulmão, traqueia e cérebro [Wu, Li et al., 2002]. Tanto o GLUT-7 quanto o GLUT-9 ainda não estão caracterizados funcionalmente. Uma característica dos componentes da classe III (GLUT-6, GLUT-8, GLUT-10, GLUT 12 e HMIT-1) como já vimos é a localização do sítio de glicosilação na alça 9. Este sítio de glicosilação, também é importante para a função do GLUT-1 [Asano, Katagiri et al., 1991] e é encontrado na alça 1 nas duas outras classes, isto é, classes I e II. A localização intracelular de GLUT-6 e do GLUT-8, se deve a uma simples característica essencial, isto é, a dileucina em seu N-terminal e em ambos os casos o tratamento com insulina não induz o deslocamento da proteína para a superfície celular [Lisinski, Schurmann et al., 2001].

GLUT-1

O GLUT-1 também chamado transportador de açúcar de eritrócitos é codificado pelo gene SLC2A-1 é encontrado de forma abundante na membrana de eritrócitos. Considerando, ser abundante nos eritrócitos e a relativa facilidade de trabalhar com esse material foi possível o seu estudo estrutural e funcional [Cura, Carruthers 2012; Mueckler, Caruso et al., 1985; Mueckler, Thorens 2013]. A proteína é constituída por 492 amino ácidos, sendo encontrada além dos eritrócitos, na barreira hematocefálica, cérebro, placenta e rins [Augustin 2010]. O GLUT-1 apresenta-se sob duas isoformas, ambas codificadas pelo mesmo gene (SLC2A-1) e diferem entre si pela quantidade de sítios de glicosilação e peso molecular. A isoforma de peso molecular 55 KDa é encontrada nas células endoteliais da barreira hematoencefálica e nos eritrócitos [Devraj, Klinger et al., 2011; Sogin, Hinkle 1980]. Expressão abundante da isoforma de 45 KDa, não glicosilada foi observada em astrocitos humanos, macaco e rato [Leino, Gerhard et al., 1997; Morgello, Uson et al., 1995]. A glicose é sem dúvida alguma o principal substrato para o GLUT-1, contudo, o GLUT-1 também é capaz de transportar outras moléculas como galactose, manose, glicosamina, ácido ascórbico reduzido (ácido dehidroascórbico). Por outro lado, sua atividade de transporte é inibida por citocalasina e floretina [Cura, Carruthers 2012]. As citocalasinas são metabolitos extraídos de fungos e compreendem mais de 20 variedades, denominadas por letras (A, B, C, D etc). É muito usada em pesquisa citológica e caracterização das propriedades da actina (G e F), isto é, a globular (actina G) e a filamentosa (actina F). As catalasinas inibem a polimerização da actina globular (actina G) para actina filamentosa (actina F). Por outro lado, publicações mostram que as catalasinas se ligam ao transportador de glicose no eritrócito (GLUT-1) [Lin, Spudich 1974; Lin, Spudich 1974]. A ligação da citocalasina ao transportador de glicose de eritrócitos (GLUT-1), altera o equilíbrio das conformações do transportador [Walmsley, Lowe, Henderson 1994].

A floretina é um polifenol encontrado em frutas, que exerce vários efeitos biológicos incluindo, propriedades antioxidante, antitumor e antiinflamatória. A floretina diminui de forma significativa os genes proinflamatórios, reprimindo a ativação de transdução de sinal dependente de fatores de transcrição [Choi 2019; Jung, Triebel et al., 2009]. Por outro lado, a floretina exerce efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos, aumentando o consumo de glicose, através do deslocamento e expressão do GLUT-4 [Shen, Zhou et al., 2017; Shu, Lu et al., 2014]. A constante de Michaelis-Menten (K_m) de GLUT-1 para glicose é cerca de 3 mM, enquanto para glicosamina é 2,1 mM [Carruthers, DeZutter et al., 2009; Uldry, Ibberson et al., 2002].

Estudos do transportador de glicose em eritrócitos humanos mostraram duas características notáveis. Primeiramente, a afinidade aparente (K_m ou meia saturação da concentração do substrato) para o transporte sob certas condições experimentais, maior no sítio de ligação do substrato externo do que no sítio de ligação interno (citoplasma) e segundo, o transporte ocorre numa taxa mais rápida quando o substrato está presente no lado trans da membrana (o lado da membrana no qual o transporte está sendo medido) comparado a condições trans zero onde o substrato está presente somente no compartimento aquoso a partir de onde o transporte está sendo medido. O último fenômeno é chamado aceleração trans ou de troca e sugere que a alteração conformacional envolvendo o transporte não carregado é um fator limitante para o transporte ocorrer [Mueckler, Thorens 2013].

O GLUT-1 é a forma quantitativamente mais significativa, expresso nos glóbulos vermelhos humanos, perfazendo cerca de 10 a 20% do total de proteínas [Gorga, Lienhard 1982]. Pontes de hidrogênio são formados pelas hidroxilas dos carbonos 1 e 3 da glicose quando presente no sítio de captação do GLUT-1 [Barnett, Holman et al., 1975]. O GLUT-1 transporta igualmente as formas α e β glicose [Leitch, Carruthers 2009]. A captação da glicose pelos eritrócitos pode ser dividida em três fases [Blodgett, Carruthers 2005]; a primeira fase, que é rápida, porém em pequena quantidade, descreve a associação do açúcar com o GLUT-1 (1 mol do açúcar: 1 mol de GLUT-1); a segunda fase, rápida descreve a importação do açúcar ao citosol e é responsável por 2/3 da captação total de glicose pelos eritrócitos; a terceira fase, uma fase lenta, descreve a diminuição do transporte pela saturação da face interna dos sítios de ligação [Leitch, Carruthers 2009]. A expressão do GLUT-1 em vários tecidos, como cérebro, músculo esquelético e miocárdio é alta durante o período de amamentação de vida. No entanto, após esse período, há um declínio na expressão do GLUT-1 em todos os tecidos exceto no cérebro. Este declínio é substituído pela isoforma responsiva a insulina, isto é, o GLUT-4 [Devaskar, Zham et al., 1991; Kahm, Rajakumar et al., 1999; Sadiq, Das et al., 1999; Schroeder, Doria-Medina et al., 1997]. A regulação da expressão de GLUT-1 ocorre em dois níveis, a nível de transcrição e a de pós-transcrição. A regulação transcricional envolve dois fatores nucleares o Sp-1 de ativação e o Sp-3 de repressão. A relação entre esses dois fatores nucleares determina a expressão tanto do mRNA quanto da proteína GLUT-1 [Hwang, Ismail-Beigi 2006; Santalucia, Boheler et al., 1999].

GLUT-2

O transportador de glicose tipo 2 (GLUT-2) é expresso de forma abundante nos hepatócitos, nas células pancreáticas e no cérebro. O GLUT-2 apresenta uma sequência de amino-ácidos com 55% de homologia ao GLUT-1 [Fukumoto, Seino et al., 1988; Michau, Guillemain et al., 2013]. O GLUT-2 apresenta uma constante de Michaelis-Menten (K_m) alta (cerca de 17 mM), o que significa que o transportador tem baixa afinidade e alta capacidade de transporte, sendo o K_m mais alto, comparado aos outros membros da família GLUT [Johnson, Newgard et al., 1990]. O seu K_m varia para outros monossacarídeos, assim para galactose é de cerca de 92 mM, manose 125 mM, e frutose 76 mM [Johnson, Newgard et al., 1990]. Pelo fato do GLUT-2 apresentar alto

Km para glicose, o que significa baixa afinidade e alta capacidade de transporte, ele é considerado como um sensor para glicose, especialmente no fígado e nas células beta pancreáticas [Gould, Thomas et al., 1991]. Vejamos como exemplo, o que acontece no fígado no estado alimentado (pós-prandial) e no estado de jejum. O fígado é um órgão homeostático. Quando a concentração plasmática da glicose é alta (pós-prandial) o fígado retira a glicose do sangue de forma rápida. Dentro da célula, a glicose é rapidamente fosforilada a glicose-6-fosfato, um processo que impede sua saída da célula. A fosforilação é catalisada pela hexoquinase, uma enzima com Km baixo, o que significa alta afinidade ao substrato, e quando a concentração da glicose se eleva a reação também é catalisada pela glicoquinase, que apresenta um Km alto. A glicose fosforilada (glicose-6-fosfato), não sai da célula, de maneira que é utilizada para a síntese de glicogênio, um polissacarídeo de reserva; para a via glicolítica formando piruvato ou pela via pentose fosfato, gerando NADPH, para processos biossintéticos. O piruvato que se forma na via glicolítica é oxidado a acetil-coenzima A, o qual pode ser convertido a triacilglicerol ou ser oxidado a CO₂ e H₂O no ciclo de Krebs, gerando ATP. Este é um quadro que descreve o que ocorre no fígado após a alimentação (pós-prandial).

No jejum, a glicogenólise é mobilizada para fornecer glicose para a corrente sanguínea, o que ocorre durante um certo tempo, depois do que o corpo fica na dependência da via gliconeogênica, isto é, produção de glicose a partir de lactato, glicerol e alanina. Logo, no jejum o corpo depende de processos como a glicogenólise e gliconeogênese para ter a disponibilidade da glicose. Quando a concentração da glicose for alta, a baixa afinidade e alta capacidade cinética do GLUT-2, torna o transporte de glicose mais efetiva. A direção do transporte, influxo ou efluxo, vai depender das concentrações da glicose, intra e extracelular. O GLUT-2 é também considerado um sensor de glicose para as células β pancreáticas, sendo importante para a secreção de insulina estimulada pela glicose, GSIS (*Glucose Stimulated Insulin Secretion*). O fígado e as células β pancreáticas compartilham o mecanismo comum, que traduz a resposta do fator de transcrição ChREBP (*Carbohydrate Responsive Element Binding Protein*), um fator chave para induzir os genes glicolíticos e lipogênicos em ambos os tipos de células [Dentin, Denechaud et al., 2006; Chadt, Al-Hasani 2020].

Em resumo, o GLUT-2 é a isoforma mais abundante nos hepatócitos, sendo a responsável pela maior parte da captação de glicose, porém sem interceder diretamente na produção de glicose hepática [Guillam, Burcelin, Thorens B 1998] é considerado um sensor de glicose hepatoportal [Burcelin, Dolci, Thorens 2000]; a deficiência de SLC2A2 (gene que codifica o GLUT-2) causa a síndrome de Fanconi-Bickel [Enogieru, Ung et al., 2019]. A síndrome de Fanconi-Bickel é uma doença metabólica rara, devido a deficiência de GLUT-2, em que há armazenamento de glicogênio, principalmente no fígado e rins, sendo também conhecida como glicogenose.

GLUT-3

O transportador de glicose tipo 3 (GLUT-3) é encontrado nos neurônios, sendo o principal transportador para captação de glicose nesse tecido, contudo também é expresso em tecidos cuja demanda por glicose é alta, como glóbulos brancos, testículo, espermatozoide e alguns tipos de cancer [Harik, Kalaria et al., 1990; Simpson, Dwyer et al., 2008]. O GLUT-3 apresenta em sua estrutura aminoácidos como glicina, serina e arginina que são capazes de formarem ligações de hidrogênio com a glicose [Simpson et al., 2008]. O gene SLC2A3, que codifica o GLUT-3 foi primeiramente clonado a partir de uma linha de células do músculo esquelético fetal humano [Kayano, Fukumoto et al., 1988]. Apresenta uma identidade sequencial de cerca de 64% com SLC2A1, e sua constante de Michaelis-Menten (Km) é baixa significando que tem alta afinidade para glicose. O “turnover number” (número de renovação) é o mais alto do que os outros membros

da classe I, sendo a D-glicose o seu substrato fisiológico [Manolescu, Augustin et al., 2007; Muekler, Thorens 2013]. Para uma enzima o número de renovação (turnover number) revela a taxa máxima da reação enzimática (V_{max}) e representa o número de moléculas do substrato convertido a produto por uma molécula da enzima na unidade de tempo, quando a enzima está totalmente saturada. No caso do transportador de glicose, podemos dizer que o número de renovação é o número de moléculas de glicose transportado por uma molécula do transportador na unidade de tempo. O fato do GLUT-3 apresentar um K_m baixo para glicose confere a esse transportador um papel crítico na captação de glicose pelos neurônios, visto que a concentração de glicose que circunda o neurônio é de somente 1-2 mM, comparado a 5-6 mM do soro [Simpson, Dwyer et al., 2008]. Num estudo *in vivo* foi observado que a expressão do mRNA do GLUT-3 no cérebro de rato pré-natal era muito baixo contudo, o mRNA do GLUT-3 foi detectado nas células de neurônios que tinham migrado para o córtex cerebral [Bondy, Lee, Zhou 1992]. A expressão do GLUT-3 é crucial para a otimização da pre-implantação e desenvolvimento do embrião. A expressão de GLUT-3, tendo-se em vista sua alta afinidade para glicose se correlaciona com a compactação e mudança na preferência metabólica para glicose versus piruvato [Pantaleon, Harvey et al., 1997]. O GLUT-3 também está presente nos linfócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e plaquetas. Nos glóbulos brancos, o GLUT-3 está presente num pool intracelular, de onde pode ser recrutado para a membrana plasmática [Estrada, Elliott et al., 1994]; Fu, Mayanu et al., 2004; Maratou, Dimitriadis et al., 2007]. Os linfócitos são células do sistema linfóide responsáveis por reações imunes. Existem duas categorias de linfócitos; aqueles que dependem do timo, ditos linfócitos T, e os que não dependem do timo ditos linfócitos B. Os linfócitos T são os responsáveis pelas reações que ocorrem mediados pelas células, enquanto os linfócitos B são os precursores das células que sintetizam e secretam anticorpos. As plaquetas são corpúsculos desprovidos de núcleo cuja função é a de impedir a saída de sangue de vasos sanguíneos lesados. Os neutrófilos, mononucleares constituem a primeira linha de defesa celular contra os microorganismos. Os monócitos são células que apresentam a capacidade de sair dos capilares e penetrar no tecido conjuntivo onde exercem a função fagocitária. Macrófagos são células com grande capacidade de pinocitose e fagocitose atuando como elemento de defesa.

A fusão de GLUT-3 com a membrana plasmática nos neurônios é induzida pela despolarização da membrana, resultando num aumento da captação de glicose [Uemura, Greenlee 2001]. A insulina pode regular a captação de glicose pelos neurônios promovendo o deslocamento de GLUT-3 e fusão com a membrana plasmática [Uemura, Greenlee 2006]. Esses pesquisadores sugerem que a captação de glicose pelos neurônios é regulada por dois fatores separados: a promoção do deslocamento de GLUT-3 à membrana plasmática e a despolarização da membrana que induz a fusão das vesículas de GLUT-3 com a membrana.

GLUT-4

O transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4), que está presente nos músculos esqueléticos e cardíacos e no tecido adiposo é o transportador de glicose mais estudado, constituindo-se numa etapa limitante da taxa de captação de glicose estimulada pela insulina [Huang, Czech 2007]. A capacidade do GLUT-4 de transportar a glicose é direcionada pela sequência de amino ácidos no N-terminal, com um resíduo de fenilalanina, e o C-terminal, que requer a presença da dileucina e resíduos acídicos, sendo altamente responsivos a insulina [Piper, Tai et al., 1993; Al-Hasani, Kunamneni et al., 2002; Johnson, Subtil et al., 1998; Johnson, Lampson, McGraw 2001; Hou, Suzuki et al., 2006]. Na condição pós-prandial em que a concentração da glicose sanguínea se eleva, o músculo esquelético exerce um papel preponderante para a redução da concentração da glicose sistêmica. Ao desempenhar um papel crítico na homeostase da glicose, o músculo esquelético responde por cerca de 75% da redução da concentração de glicose do

sangue. [De Fronzo, Jacot et al., 1981]. A atividade física aumenta a sensibilidade do músculo a insulina, de modo que o exercício físico e insulina atuam de forma sinérgica, intensificando a disponibilidade da glicose para o músculo [DeFronzo, Ferrannini et al., 1991]. Existem três tipos de músculos, esquelético, cardíaco e liso. O músculo esquelético de aparência estriada é formado por células cilíndricas, apresentam contração controlada por ações voluntárias. O músculo cardíaco, também de aparência estriada é formado por células alongadas e ramificadas e apresentam contração involuntária. O músculo liso não é estriado, é formado por células fusiformes e contração involuntária.

Já o tecido adiposo é um órgão altamente dinâmico, consumindo energia de forma contínua, sendo considerado um reservatório de energia. Dois tipos de tecido adiposo são considerados, o tecido adiposo comum também chamado tecido adiposo branco e o tecido adiposo pardo. Este tecido chama-se pardo pela grande quantidade de mitocôndrias que apresenta dando um aspecto pardo. Sendo rico em mitocôndrias o tecido adiposo pardo é especializado em dissipar energia sob a forma de calor. A contribuição do tecido adiposo na redução da concentração de glicose do sangue é muito pequena. [Chadt, Al-Hasani 2020]. O tecido adiposo expressa os seguintes transportadores, GLUT-1, GLUT-4, GLUT-8 e GLUT-10

O músculo esquelético expressa os transportadores de glicose GLUT-1, GLUT-4 e GLUT-12, o transportador de frutose GLUT-5, o transportador GLUT-10 localizado na mitocôndria que é envolvido no transporte mitocondrial do ácido dehidroascórbico (é a forma oxidada do ácido ascórbico), podendo proteger contra o estresse oxidativo [Chadt, Al-Hasani 2020; Hundal, Egan et al., 1992; Lee, Huang et al., 2010]. No músculo esquelético, o GLUT-4 se constitui no principal transportador de glicose, enquanto o GLUT-1 representa cerca de 5-10% dos transportadores de glicose [Marette, Richardson et al., 1992]. No rato, o GLUT-4 é expresso de forma diferente nas fibras musculares oxidativas e glicolíticas [Kern, Wells et al., 1990; Camps, Castello et al., 1992]. A expressão do GLUT-4 no músculo esquelético é regulada pelo metabolismo e insulina. Foi observado em cultura de células musculares humanas, que um aumento na expressão da enzima glicogênio fosforilase, aumenta a expressão do GLUT-4 [Baque, Montell et al., 1998]. A glicogênio fosforilase é uma enzima envolvida no metabolismo do glicogênio. O glicogênio é um polissacarídeo, constituído de glicose, que é armazenado tanto no fígado quanto no músculo, porém para diferentes finalidades. No fígado, o glicogênio é a reserva de glicose, que é usado para a manutenção da concentração de glicose do sangue. Por outro lado, no músculo, o glicogênio armazenado representa o combustível usado para a produção de ATP. Já a glicogênio fosforilase é uma enzima que catalisa a fosforólise do glicogênio, uma reação em que o íon fosfato é usado para clivar a ligação glicosídica, da terminação não redutora do glicogênio, fornecendo a glicose-1-fosfato.

O influxo de glicose envolve GLUT-4 e hexoquinase [Antonescu, Thon et al., 2005; Fueger, Searer et al., 2005]. O fato do GLUT-4 ter uma relação com a hexoquinase é compreensível já que a glicose transportada para dentro da célula deve ser fosforilada, para ser aproveitada pela célula.

A existência nos tecidos, adiposo e muscular, de um compartimento intracelular limitado por uma membrana, foi previsto através de modelo matemático da cinética de GLUT-4. Observou-se, que o GLUT-4 trafega entre a membrana plasmática e os endossomos, além de um compartimento adicional [Holman, Lo-Leggio, Cushman 1994]. Este compartimento adicional foi denominado vesícula de armazenamento de GLUT-4, GSVs (*GLUT-4 Storage Vesicles*) e vesículas responsivos a insulina, IRV (*Insulin Responsive Vesicles*) [Karylowski, Zeigerer et al., 2004; Lizonov, Matsumoto et al., 2005]. Estudos de imunologia e microscopia eletrônica mostraram, que do total de GLUT-4 cerca de 75% estão confinados em vesículas de 50-80 nm (nanômetros) de diâmetro [Bryant, Govers, James 2002], enquanto o restante do GLUT-4 é encontrado em outras estruturas como endossomos e rede trans-Golgi, TGN (*Trans Golgi Network*). Os estudos sobre

a composição proteica das vesículas GLUT-4 apontam, que além da proteína GLUT-4, foram detectadas IRAP (Insulin Responsive AminoPeptidase), sortilina e LRP-1 (Lipoprotein Receptor related Protein-1) [Larance, Ramm et al., 2005; Jedrychowski, Gartner et al., 2010; Kandror, Pilch 2011]. IRAP é a sigla de aminopeptidase responsivo a insulina, que trafega junto com GLUT-4 no itinerário intracelular. A sortilina desempenha um papel no recrutamento da carga para o GSV (Glucose Storage Vesicles) durante a formação da vesícula. Aminopeptidases são enzimas proteases, isto é, enzimas que atuam nas ligações peptídicas de proteínas, removendo o amino ácido N-terminal. Após remover o amino ácido N-terminal, a enzima passa a atuar no amino ácido que ficou sendo o N-terminal e assim sucessivamente. A enzima por atuar nas extremidades da proteína é classificada como exopeptidase. A aminopeptidase regulada pela insulina (IRAP) é uma metaloprotease de zinco, transmembrana com várias funções biológicas [Chai, Gutierrez-de-Teran, Stratikos 2021], sendo também conhecida como leucina aminopeptidase (PLAP) e oxitocinase. É uma proteína transmembrana, apresentando o segmento N-terminal no citoplasma e o C-terminal extracelular, além do segmento transmembrana. O domínio extracelular, isto é, o C-terminal responde pela capacidade da IRAP de cortar peptídeos antigênicos e hormônios peptídicos, enquanto o domínio N-terminal intracelular parece controlar o tráfego intracelular e eventos de sinalização [Chai, Gutierrez-de-Teran, Stratikos al. 2021]. Após a ligação com o seu substrato específico, o C-terminal do IRAP pode dimerizar e alterar sua conformação [Mpakali, Saridakis et al., 2017]. A IRAP foi identificada em vesículas intracelulares, as quais também abrigam o GLUT-4, vesículas essas derivadas das frações microssomais de baixa densidade de adipócitos e músculo esquelético. A IRAP é deslocada para a superfície celular estimulada pela insulina [Mastick, Aebersold, Lienhard 1994; Kandror, Pilch 1994]. Quando descoberta a IRAP foi nomeada vp 165 para proteína vesicular de 165 KDa na maioria dos tecidos e 140 KDa no cérebro [Keller, Scott et al., 1995].

Um aspecto que chama a atenção se relaciona a função fisiológica da IRAP, bem como, o seu papel desempenhado na ação da insulina. Uma explicação aventada é a seguinte: em condições basais a IRAP fica sequestrada dentro da vesícula GLUT-4, portanto sem ter acesso a seus substratos. Pela ação da insulina, a IRAP é deslocada para a superfície celular, possibilitando o contato com seus substratos extracelulares, atuando dessa forma na clivagem do amino ácido terminal [Keller 2004]. Estudos da relação IRAP/GLUT-4 em camundongos sem o gene da IRAP (IRAP -/-) mostraram redução dos níveis de GLUT-4 nos tecidos onde a IRAP é expressa de forma predominante, isto é, músculo esquelético, coração e tecido adiposo. Isso sugere que a presença de IRAP é um requisito para a manutenção dos níveis de GLUT-4 [Keller, Davis, Clairmont 2002].

Outro componente da vesícula GLUT-4 é a sortilina. A sortilina é uma proteína composta de 833 amino ácidos, e nos humanos é um receptor de alta afinidade para a neurotensina [Mazella, Chabry et al., 1989; Mazella, Zsurgur et al., 1998]. A neurotensina é um peptídeo formado por 13 amino ácidos que atua no cérebro de mamíferos como um neurotransmissor primário ou neuromodulador de neurotransmissores clássicos. Existe uma estreita relação entre a neurotensina e a dopamina [Katsanos, Anogianakki et al., 2008]. Dois receptores de neurotensina, a NTS1 e NTS2 pertencem a família de receptores de 7 domínios transmembrana acoplada a proteína G [Kitbagib 2007].

A sortilina é uma proteína transmembrana, com um domínio extracelular rico em aminoácido cisteína, e um C-terminal intracelular, que está envolvido em sua internalização [Petersen, Elgaard et al., 1996; Petersen, Nielsen et al., 1997]. A expressão da sortilina é reduzida em várias condições fisiopatológicas, tais como por exemplo, a obesidade e essa repressão é dependente do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [Blondeau, Beraud-Dufour et al., 2019]. TNF- α é uma citocina pro-inflamatória, de natureza glicoproteica, que desempenha um papel complexo, em resposta a

injúria e infecção, angiogênese, apoptose e outros processos [Old 1988]. Entre os vários fatores causais da relação, resistência à insulina e diabetes tipo 2, as citocinas pró-inflamatórias são muito importantes [Akash, Rehman, Chen 2013; Rehman, Akash 2016]. Acredita-se que a alta expressão de TNF- α (Tumor Necrosis Factor) no tecido adiposo seja a causa da resistência à insulina. Nesse aspecto como o músculo esquelético é considerado o principal sítio da resistência à insulina periférica, segue que o TNF- α do tecido adiposo causaria seus efeitos nos músculos através da via circulatória [Borst 2004]. Evidências apoiam a hipótese que o TNF- α produzido localmente atua de forma parácrina para causar resistência à insulina [Borst SE, Bagby GJ 2002; Saghizadeh, Ong et al., 1996].

A proteína-1 relacionada ao receptor lipoproteico, LRP-1 (*Lipoprotein Receptor Protein-1*) ou CD 91 de baixa densidade é uma proteína transmembrana pertencente à família de receptores lipoproteicos de baixa densidade [Gonias, Campana 2014]. O LRP-1 é expresso em vários tecidos como neurônios, células epiteliais e musculares, fibroblastos, monócitos, macrófagos, hepatócitos, adipócitos, células musculares lisas e células tumorais [Gonias, Campna et al., 2014; Barcelona, Luna et al., 2010; Actis-Dato, Chiabrando 2018]. O deslocamento de LRP-1 é essencial para a atividade de sinalização do receptor de insulina, bem como para a expressão de GLUT-4 na membrana plasmática [Liu, Hu et al., 2015; Actis Dato, Grosso et al., 2018]. Nos adipócitos e tecido muscular a LRP-1 é importante para a formação e função de GSVs [Jedrychowski, Gartner et al., 2010]. Uma interação entre LRP-1 e o receptor de insulina, que pode regular a sinalização da insulina e a captação de glicose pelos neurônios, foi descrita para o cérebro [Liu, Hu et al., 2015].

O deslocamento intracelular de GLUT-4 pode ser descrito da seguinte maneira: nos tecidos não estimulados o GLUT-4 está presente predominantemente nos GSVs. A rede trans-Golgi TGN, gera o GSV de modo, que TGN, GSV e endossomos formam uma alça intracelular de tráfego, contribuindo para a retenção de GLUT-4. Uma vez estimulada pela insulina, os GSVs se fundem com a membrana plasmática reduzindo a retenção nos endossomos, o que leva a redistribuição de GLUT-4 na membrana plasmática. Enquanto o estímulo pela insulina persistir, o recrutamento das moléculas de GLUT-4 continua a reciclar entre a membrana plasmática e os endossomos [Govers 2004]. Nas células do tecido adiposo, parte do pool de GLUT-4 está localizado no compartimento endossômico, o qual, também é sensível a insulina [Livingstone, James et al., 1996; Zeigerer, Lampson et al., 2002]. Endossomos são pequenas vesículas intracelulares formados por endocitose, que transfere o seu conteúdo aos lisossomos.

O transporte de glicose pelo GLUT-4 é realizado em duas etapas. Na primeira etapa a glicose deve se ligar a superfície do transportador, enquanto, na segunda etapa a glicose é movimentada em direção ao citosol através de uma alteração conformacional do transportador. Portanto, em seu trajeto até o citosol, a glicose se associa de forma sequencial a vários sítios do canal do transportador [Naftalin 2010]. O número de transportadores na membrana plasmática é determinante para a eficiência do transporte da glicose, donde se conclui que o deslocamento de GLUT-4 até a superfície celular é importante para o processo. O itinerário de GLUT-4 na célula se reveste de interesse para os pesquisadores. Estudos cinéticos sugerem um tráfego através de 3 compartimentos a saber, membrana plasmática, endossomos e o compartimento responsivo à insulina [Holman, Lo Leggio, Cushman 1994]. Dois modelos são descritos para adipócitos relacionados as trocas que ocorrem entre GSV, endossomos e membrana plasmática, o modelo estático e o modelo dinâmico. O modelo dinâmico, como o próprio nome sugere descreve um equilíbrio dinâmico no pool de GLUT-4 reciclante, que não é alterado pela insulina. Este hormônio, atua na redistribuição de GLUT-4, que afeta as várias fases do tráfego [Karylowski, Zeigerer et al., 2004; Martin, Lee, McGraw 2006]. Ao contrário, no modelo estático os GSVs não são acessíveis a endossomos e membrana plasmática [Govers, Coster, James 2004; Coster,

Govers, James 2004]. A entrada de GSVs na via reciclante causada pela insulina ocorre por um mecanismo de liberação quanta, isto é, o aumento da concentração de insulina, mobiliza o aumento de GLUT-4. Neste modelo, os GSVs são os principais sítios de ação da insulina. A principal distinção entre esses dois modelos repousa na detecção do fluxo nas células não estimuladas. Um fluxo muito baixo significa que ele não pode ser detectado, então o pool é completamente sequestrado, aplicando-se então o modelo estático. Se o fluxo for detectável, então o modelo dinâmico descreve melhor os dados [Bogan 2012]. Numa via exocítica, a insulina pode atuar na formação do broto vesicular, retenção e liberação bem como a atracção e fusão na membrana plasmática. Em células não estimuladas, os componentes de GSVs estão internalizados por endocitose nos primórdios de endossomos, até que um sinal da insulina libera os GSVs e carrega essas vesículas com microtúbulos motores para o deslocamento até a membrana plasmática [Jovic, Sharma et al., 2012; Ogan 2012; Xu, Rubin et al., 2011].

Outro aspecto a ser mencionado diz respeito ao complexo GLUT-4-TUG (*TUG = Tether containing a Ubiquitin like UBx domain for GLUT-4*), que é uma proteína codificada pelo gene ASPSCR1, que regula o tráfego de GLUT-4, mas não de proteínas endossomais. A insulina atua estimulando a dissociação do complexo GLUT-4-TUG de modo que o número de complexo que é dissociado, controla a magnitude da resposta ao deslocamento inicial. Baseado nesses dados foi lançado a hipótese que o TUG liga um sítio de ancoragem intracelular, prendendo o GSV nesse local e que a insulina então libera essa amarra para mobilizar GSV [Li, Habtemichael et al., 2019]. Admite-se que o TUG aprisiona o GLUT-4, que é incorporado no GSV, retém o pool de GLUT intracelular em células não estimuladas com insulina. Em termos funcionais, o TUG aproxima o GLUT-4 para uma estrutura intracelular, para prevenir o movimento à superfície celular. A insulina então libera essa associação para mobilizar o GSV [Rubin, Bogan 2009].

GLUT-5

O GLUT-5 é um transportador de frutose, que pertence a classe II de transportadores facilitativos. Apresenta uma constante de Michaelis-Menten de cerca de 6 mM ($K_m=6\text{mM}$), significando uma alta afinidade para seu substrato. É expresso no intestino, músculo esquelético, tecido adiposo, testículo, espermatozoide e cérebro [Burant, Takeda et al., 1992; Kayano, Burant et al., 1990; Shepherd, Gibbs et al., 1992]. Dois segmentos helicoidais transmembrana (7 e 10) do GLUT-5 parecem ter um papel central no acoplamento com a molécula de frutose e na transição conformacional [Nomura, Verdon et al., 2015]. Um aspecto que intrigou os pesquisadores, foi o que ocorre com o transporte de hexoses no intestino, enquanto o GLUT-2 reconhece tanto a glicose quanto a frutose, o GLUT-5 discrimina entre as duas formas. Buscando entender a razão, estudou-se inicialmente a diversidade entre as conformações das duas hexoses em solução. Foi verificado que a glicose apresenta 99% da conformação piranosídica enquanto a frutose 67,5% na forma piranosídica e 31,5% na forma furanosídica [Angyal 1984]. Contudo, dados de proteínas para a estrutura cristalina ligados a glicose e frutose apontam para a glicose a conformação piranosídica como predominante, enquanto para a frutose é a forma furanosídica que predomina. Comparações entre as duas conformações mostram diferenças significantes nas posições dos grupos hidroxilas [Ferraris, Choe, Patel 2019].

O metabolismo oxidativo da frutose ocorre em vários tecidos como intestino, fígado, rins, bem como, também, no cérebro. Injeções de frutose marcada ($\text{C}^{14}\text{-D}$ frutose) no cérebro de ratos mostrou após incubação dos terminais nervosos isolados, que a marcação aparecia na alanina, glutamato, ácido gama amino butírico, e glutamina [Hassel, Elsaïs et al., 2015]. Dentro da célula a frutose pode ser fosforilada pela frutoquinase, também chamada cetohecoquinase, enzima que é expressa no intestino humano, que transforma a frutose em frutose-1-fosfato. A

frutoquinase, também é expressa no fígado, caracteriza-se pelo baixo constante de Michaelis-Menten ($K_m = 0,5 \text{ mM}$) [Adelman, Ballard, Weinhouse 1967], significando um metabolismo rápido da frutose no fígado. A frutose-1-fosfato formada pode ser clivada, pela ação da aldolase B a gliceraldeído e dihidroxiacetona fosfato. A gliceraldeído pode sofrer uma fosforilação transformando-se no gliceraldeído-3-fosfato, o qual juntamente com a dihidroxiacetona fosfato pertencem a via glicolítica [Diggie, Shires et al., 2007]. O GLUT-5 é um transportador que pode atuar como um transceptor, isto é, um transportador que após ligação ao substrato ativa a sinalização intracelular que inicia a resposta [Taylor 2014], capaz de sentir os níveis de frutose, iniciando uma resposta adaptativa que liga a expressão dos níveis dos transportadores e enzimas para prevalecer concentrações de nutrientes [Ferraris, Diamond 1997].

GLUT-6

O GLUT-6 é um transportador de hexose, antes nomeado GLUT-9, expresso de forma prevalente no cérebro, baço e leucócitos e apresenta baixa afinidade para o transporte de glicose [Joost, Thorens 2001; Doege, Bocianski et al., 2000]. O GLUT-6 é uma proteína encontrada em compartimento intracelular, nos lisossomos e sofre reciclagem endocítica independente de insulina [Lisinski, Schurmann et al., 2001; Maedera, Mizuno et al., 2019; Martinez, Cifuentes et al., 2019]. Em sua extremidade N-terminal (grupo amino livre), é encontrado o chamado motivo dileucina (dileucine motif) (motif é um conjunto de resíduos de aminoácidos presente em diferentes polipeptídeos). No presente caso, esse conjunto de resíduos, que contém dois resíduos de leucina, é composto por E-K-I-T-L-L (glutamato-lisina-isoleucina-treonina-leucina-leucina) sendo responsável pela localização intracelular, cujo deslocamento não é induzido pelo estímulo da insulina [Cura, Carruthers 2012]. A estimulação celular por fatores tais como insulina, ésteres de forbol e choque osmótico, não recruta o GLUT-6 para a membrana plasmática [Lisinski, Schurmann et al., 2001]. A expressão de mRNA de GLUT-6, também foi detectada em leucócitos, coração e pâncreas de humanos e macrófagos de camundongos [Caruana, Byrne et al., 2019; Maedera, Mizuno et al., 2019]. As análises, metabolômica e *in vitro*, mostram que o GLUT-6 age como um modulador da glicólise em macrófagos inflamatórios. O GLUT-6 pode ser considerado um transportador lisossomal, que é regulado por estímulos inflamatórios e que regula a resposta inflamatória afetando o metabolismo de macrófagos [Maedera, Mizuno et al., 2019]. Metabolômica é uma metodologia que visa identificar e quantificar os metabólitos de uma via metabólica.

GLUT-7

O GLUT-7 é um transportador de hexose, que é expresso primariamente no intestino delgado e cólon, embora seu mRNA também foi detectado no testículo e próstata [Li, Manolescu et al., 2004]. Tanto a glicose quanto a frutose são substratos para o GLUT-7. A análise cinética do transporte de glicose e da frutose pelo GLUT-7, mostra que a constante de Michaelis-Menten é muito baixa ($K_m = 0,3 \text{ mM}$) para a glicose, o que confere ao transportador alta afinidade a esse substrato [Cheeseman 2008]. Existe uma estreita relação entre o GLUT-7 e o GLUT-5, tendo em comum 53% de homologia de sequência de aminoácidos e 68% de identidade de aminoácidos [Li, Manolescu et al., 2004; Scheepers, Schmidt et al., 2005]. Quanto a especificidade do transportador 7 para a frutose, foi observado, que no domínio transmembrana 7 tem um resíduo de aminoácido hidrofóbico, que é responsável por essa especificidade. Na posição 290 desse domínio, enquanto nos outros GLUTs estudados comparativamente a GLUT 1, 2 e 5, existe o resíduo valina, no GLUT-7 é a isoleucina (Ile) [Manolescu, Salas-Burgos et al., 2005]. A

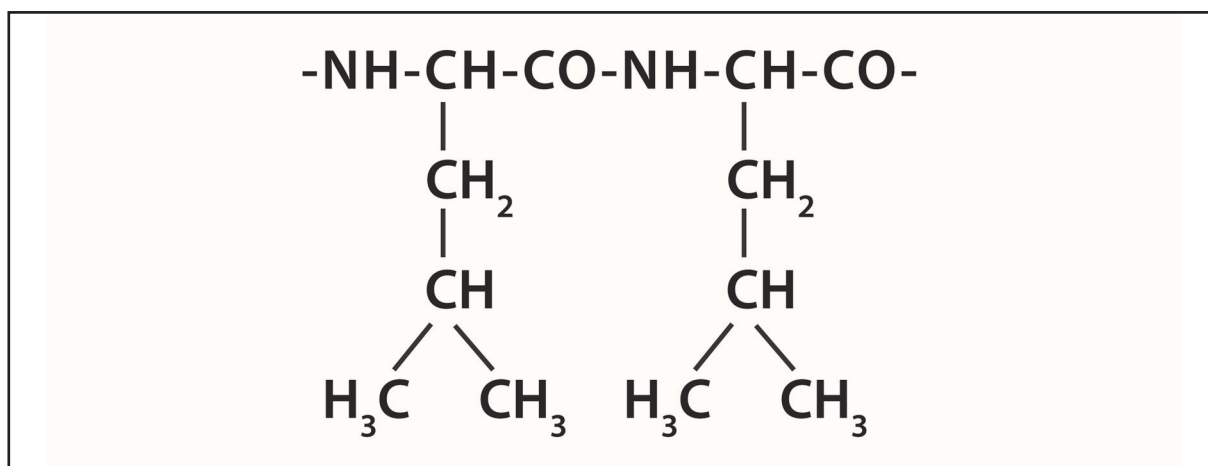
isoleucina é um amino ácido hidrofóbico, de modo, que resíduos hidrofóbicos manifestam seu papel do efeito hidrofóbico ou interação hidrofóbica exercida entre a cadeia lateral ou resíduo não polar que são os responsáveis pela compactação da flexibilização. Eles interagem com a água durante a compactação do dobramento da proteína, e essa alteração desempenha um papel crucial opara alcançar a estrutura estável de três dimensões [Manolescu, Witkowski et al., 2007; Kauzman 1959].

As proteínas GLUTs, apresentam em sua face externa do sítio, um filtro seletivo que auxilia o transportador a determinar qual substrato deve ser transportado [Cheeseman 2008]. O fato do GLUT-7 apresentar uma constante de Michaelis-Menten baixo ($K_m = 0,3 \text{ mM}$) assegura uma absorção intestinal eficiente e completa, transportando toda glicose remanescente no íleo presente 1-2 h após o consumo alimentar [Li, Manolescu et al., 2004]. Especula-se que a baixa capacidade de transporte para glicose e frutose exibida pode indicar que o GLUT-7 possa ter um substrato fisiológico alternativo, fora hexoses [Cheeseman 2008]

GLUT-8

O transportador GLUT-8, anteriormente denominado GLUTX1, é expresso principalmente no testículo, cérebro, glândula adrenal, fígado, baço, tecido adiposo pardo e pulmão [Ibberson, Uldry, Thorens 2000]. Diferentemente dos transportadores das classes I e II, a área hidrofóbica existente, favorece a presença de uma alça extracelular curta entre os domínios transmembrana 1 e 2 e uma alça extracelular longa entre os domínios transmembranas 9 e 10, que contém o sítio de glicosilação [Schmidt, Josst, Schurmann 2009]. A presença de um segmento diamino, leucina-leucina (dileucina) na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica do transportador constitui um fator responsável pela localização e retenção intracelular do transportador (Figura 8.1). Experimentos realizados substituindo a leucina por alanina modifica a localização de GLUT-8 para a membrana plasmática de mamíferos [Ibberson, Uldry, Thorens 2000].

Figura 8.1 - Fórmula da dileucina presente na cadeia polipeptídica



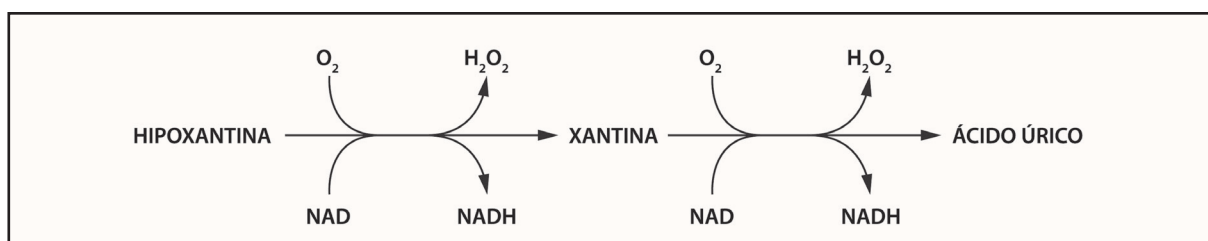
Estudos usando metodologias de imuno-histoquímica e microscopia confocal detectaram a presença de GLUT-8 no compartimento perinuclear [Widmer, Uldry, Thorens 2005]. A despolarização celular, a ativação da proteína quinase C (PKC) ou o aumento da concentração celular de cálcio são estímulos que deslocam o GLUT-8 para a membrana plasmática [Uldry, Thorens 2004; Schmidt, Joost, Schurmann 2009]. Modelos de camundongos deficientes de GLUT-8 apresentam um crescimento normal, peso corporal normal e controle glicêmico, indicando

dessa forma que esse transportador não desempenha papel significativo na manutenção da homeóstase da glicose [Gawlik, Schmidt et al., 2008; Augustin 2010]. Em suma, o GLUT-8 é um transportador intracelular de hexose encontrado em vários compartimentos celulares como retículo endoplasmático, trans-Golgi, endossomos e lisossomos.

GLUT-9

O transportador de hexose 9 (GLUT-9), também denominado transportador solúvel SLC2A9, foi identificado inicialmente como um transportador de frutose de baixa afinidade de ligação [Phay, Hussain, Moley 2000]. O GLUT-9 compartilha sequência e especificidade de substrato com os GLUTs 5, 7 e 11 [Schurman 2008; Manolescu, Salas-Burgos et al., 2005]. Ao lado do GLUT-2, o GLUT-9 é considerado importante para a percepção da concentração de glicose pelas células pancreáticas [Evans, Doblado et al., 2009]. Duas formas para GLUT-9 foram descritas, GLUT-9a e GLUT-9b, os quais apresentam idêntica sequência de aminoácidos, diferindo entre si somente no N-terminal (extremidade com grupo amino livre), sendo que a forma GLUT-9a apresenta 29 aminoácidos no N-terminal [Bibee, Augustin et al., 2013; Joost, Thorens 2001]. O GLUT-9b é expresso principalmente nos tecidos que expressam o GLUT-9a. O GLUT-9 apresenta ampla distribuição sendo expresso nos rins, fígado, placenta, pulmão, células β do pâncreas, cérebro e leucócitos [Evans, Doblado et al., 2009; Doege, Bocianski et al., 2000; Phay, Hussain, Moley 2000]. No pâncreas, GLUT-9a e GLUT-9b são expressos primariamente nas células β secretoras de insulina, onde funcionalmente participam na regulação da secreção desse hormônio. A falta de GLUT-9 causa redução dos níveis intracelulares de ATP e atenuação da secreção de insulina estimulada pela glicose [Evans, Doblado et al., 2009]. O GLUT-9 apresenta alta afinidade para o transporte de glicose com uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de 0,6 mM para a glicose e um K_m de 0,4 mM para frutose. [Manolescu, Augustin et al., 2007]. Convém ressaltar, que além de transportar hexoses, o GLUT-9 também foi descrito com um transportador de ácido úrico, com uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de 0,9 mM [Vitart, Rudan et al., 2008]. A citocalasina B um inibidor clássico de GLUTs não bloqueia a função de GLUT-9 [Augustin, Carayannoploulos et al., 2004 JBC 279: 16229-36; Bibert, Hess et al., 2009]. Em humanos, o ácido úrico é o produto final do metabolismo de nucleotídeos. Alguns nucleotídeos são metabolizados e os produtos seguem a via da salvação. A via da salvação nada mais é do que uma via metabólica para o reaproveitamento dos intermediários da degradação de uma biomolécula para a síntese dessa biomolécula. Por outro lado, outros nucleotídeos são degradados e os produtos são excretados. É o caso do ácido úrico, um composto orgânico heterocíclico. Um composto heterocíclico é um composto cíclico contendo 2 ou mais átomos diferentes na molécula. O ácido úrico é um ácido orgânico fraco e como tal está presente principalmente (99%) como sal sódico (urato monossódico) no pH fisiológico. O catabolismo de nucleotídeos, citando como exemplos o AMP (Adenosina Mono fosfato) e o GMP (Guanosina Mono fosfato), compreende uma fase inicial da retirada do grupo fosfato, por enzimas chamadas nucleotidasas, produzindo a adenosina e a guanosina respectivamente (Figura 8.2). A adenosina e a guanosina são então degradadas por vias distintas produzindo respectivamente hipoxantina e xantina.

Figura 8.2 - Reações químicas catalisadas pela xantino-oxido-redutase



A hipoxantina é oxidada pela enzima xantino oxido redutase para formar a xantina que é por sua vez oxidada a ácido úrico, como produto do catabolismo das purinas em humanos [Maiuolo, Oppedisano et al., 2016]. O oxigênio molecular, que é usado nas duas reações como oxidante é reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez é decomposto pela enzima catalase em água (H_2O) e superóxido (O^{2-}). Convém ressaltar que o hidrogênio representado na posição 7 do ácido úrico não tem posição fixa, de modo que ele pode se movimentar na molécula. É a chamada mudança tautomérica. Tautomeria é um tipo particular de isomeria em que o movimento do átomo de hidrogênio forma duas moléculas que estão em equilíbrio. A forma enólica pode perder um próton e se transforma em urato. Embora a atividade da xantino-oxidoreductase seja detectada em muitos tecidos do corpo humano, a síntese endógena de ácido úrico ocorre na maior parte no fígado, intestino, músculo e endotélio vascular [Chaudhari, Malhotra et al., 2013].

A xantino oxidoreductase purificada de humanos é um dímero constituída de duas subunidades idênticas. Contém cofatores FAD (flavina adenina dinucleotídeo), ferro e molibdenio. Apresenta-se sob duas formas interconvertíveis, a xantino desidrogenase que usa o NAD e a xantino-oxidase que usa o oxigênio molecular como aceptor de elétrons. A enzima é expressa como xantino desidrogenase, que é convertido de forma reversível a xantino oxidase, pela oxidação de grupos sulfidrilas formando -S-S- [Nishino, Okamoto et al., 2008]. A reação, da xantino redutase está associada a produção de espécies reativas de oxigênio, ânion superóxido (O^{2-}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [Battelli, Polito et al., 2016]. O envolvimento do ácido úrico com o estresse oxidativo, foi relatado a partir de estudos provando que a hiperuricemia estimula a NADPH oxidase com a consequente síntese de espécies reativas de oxigênio [Sanchez-Lozada, Soto et al., 2008; Liu, Xu et al., 2021].

GLUT-10

O GLUT-10 é um transportador facilitado de glicose que foi clonado de tecidos humanos e de camundongos. É codificado pelo gene SLC2A10, tendo a expressão do gene sido detectada em vários tecidos como músculo esquelético, coração, pulmão, cérebro, fígado, pâncreas, placenta e rins [Dawson, Mychaleckyj et al., 2001; McVie-Wylie, Lamson, Chen 2001]. A proteína GLUT-10 é constituída por 541 amino ácidos e pertence à família GLUT da classe III, contendo 30-34 % de homologia com as proteínas GLUTs. Da mesma forma que os outros membros GLUT, o GLUT-10 é formado por 12 hélices transmembrana e apresenta uma alça hidrofílica intracelular, entre as hélices 6 e 7 [McVie-Wylie, Lamson, Chen 2001], não apresenta a principal característica do segmento PESPR (prolina-glutamato-serina-prolina-arginina) presente em todos os outros membros da família GLUT, bem como nos transportadores facilitados de cátions orgânicos [Joost, Thorens 2001]. Além dessas características, o GLUT-10 tem uma alça exofacial de 90 aminoácidos, sendo mais longa do que os outros membros da família [Dawson, Mychaleckyj et al., 2001; McVie-Wylie, Lamson, Chen 2001]. Um importante indicador da função exercida pelo GLUT-10, reside na localização de seu mRNA. Por exemplo, em células musculares lisas da aorta o GLUT-10 localiza-se na mitocôndria, enquanto no tecido adiposo localiza-se no aparelho de Golgi [Lee, Huang et al., 2010]. Dentro da célula, através de sua forma oxidada, o ácido dehidro ascórbico é transportado para a mitocôndria e aumenta a concentração de ácido ascórbico intracelular e mitocondrial, que então reduz os níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (ROS), protegendo, dessa forma, as células contra o estresse oxidativo [Lee, Huang et al., 2010]. Esse processo é importante para manter a homeostase redox, a estrutura e função mitocondrial. Já sabemos que a mitocôndria é o principal local de produção de espécies reativas de oxigênio [Syu, Jiang et al., 2018]. Existe uma associação entre o GLUT-10 e a síndrome da tortuosidade arterial, ATS (*Arterial Tortuosity Syndrome*). A síndrome da tortuosidade arterial é uma desordem autossômica recessiva, caracterizada pela formação de tortuosidade, alongamento,

estenose e aneurisma das principais artérias, em razão de desorganização das fibras elásticas na camada média da parede da artéria [Wessels, Catman-Berrevoets et al., 2004; Coucke, Willaert et al., 2006].

A perda da função de GLUT-10 leva a uma redução do nível de glicose intracelular e ativação da via do fator de crescimento transformante beta (TGF β), através da decorina que é transcricionalmente regulado pela glicose [Coucke, Willaert et al., 2006]. A proliferação, diferenciação e morte celular são processos controlados por uma multitude de sinais célula-célula. Entre os reguladores destacamos a família do fator de crescimento transformante beta, TGF β (*Transforming Growth Factor β*), citocinas que podem iniciar respostas diversas, dependendo da construção genética e ambiente da célula alvo [Massague 2000]. Em humanos existem três isoformas altamente homólogas de TGF β , isto é, TGF β 1, β 2 e β 3, os quais são sintetizados como precursores pré-proteicos [Gray, Mason 1990]. Marcante na estrutura de TGF β é a chamada intersecção compacta de corda de cisteína (*Cysteine Knot*), um segmento na proteína madura que é formada por ligações dissulfeto intramoleculares, entre seis resíduos de cisteína entrelaçadas [Shi, Massague 2003]. O processo de sinalização de TGF β pode ser resumido com base em duas publicações [Schmierer, Hill 2007; Akhurst, Hata 2012]. O TGF β exerce sua ação através de dois receptores serina/treonina quinase, isto é, receptor tipo II (TpR II) e receptor tipo I (TpR I). A ligação de TGF β causa a formação de dímero do receptor II pré-formado e dímero do receptor I para formar complexos de receptores ativos [Feng, Derynck 2005]. A ligação de TGF β com o receptor II, uma quinase constitutivamente ativa dentro de um complexo receptor estabelecido, fosforila o receptor do tipo I em vários resíduos de serina e treonina, num domínio rico em glicina e serina. A fosforilação desse domínio torna possível o recrutamento da proteína SMAD (um fator de transcrição), que é regulado pelo receptor-Smad (R-SMADs). O receptor tipo I fosforila os SMADS, o que permite formar complexos com o mediador comum, SMAD4 [Shi, Massague 2003], onde o complexo R-SMAD-SMAD está diretamente envolvido na regulação da transcrição de genes alvos, ambos positivamente ou negativamente. A decorina, por sua vez é um membro da família do gene SLRP de pequenos proteoglicanos ricos em leucina [Iozzo 1999; Wight 2018]. Vamos lembrar que proteoglicanas são macromoléculas consistindo de uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas ligadas ao centro da proteína. Glicosaminoglicanas são cadeias de carboidratos, também conhecido como mucopolissacarídeo. A decorina é capaz de regular as funções celulares, restringindo as moléculas da matriz extracelular ou através de receptores da superfície celular, como é o caso do fator de crescimento transformante. A expressão em excesso da decorina inibe a fibrose e a inflamação através da redução de TGF β [Vu, Marquez et al., 2018; Chen, Lai et al., 2020].

GLUT-11

O transportador de glicose 11 (GLUT-11) é codificado pelo gene SLC2A11 e apresenta significantes semelhanças com os outros membros da família GLUT, tendo sido descrito primeiramente na membrana plasmática do coração e músculo esquelético [Doege, Bocianski et al., 2001]. Apresentam as 12 hélices transmembranas, que é a característica dos transportadores de glicose GLUT, sendo que a hélice 7 parece estar envolvida na determinação da seletividade do substrato [Arbuckle, Kane et al., 1996]. A estrutura da proteína GLUT-11 apresenta uma sequência de aminoácidos, arginina e glutamato presentes na superfície citossólica, essenciais para a função de transportador [Schurmann, Doege et al., 1997]. O GLUT-11 existe sob três isoformas, dois com modelos diferentes de expressão: a isoforma GLUT-11-L é expressa no cérebro, pulmão, leucócitos, intestino delgado, placenta e fígado [Wu, Li et al., 2002], enquanto a isoforma GLUT-11 S é expressa quase exclusivamente no coração e músculo [Doege, Bocianski et al., 2001]. Uma terceira variante, ainda não está totalmente caracterizada [Cura, Carruthers 2012].

GLUT-12

O transportador GLUT-12, um membro da classe III de transportadores foi inicialmente identificado em células epiteliais da glândula mamária, como sendo um GLUT muito semelhante ao GLUT-4 [Rogers, Macheda et al., 2002]. O GLUT-12 é uma proteína constituída por 596 aminoácidos, presente em tecidos responsivos à insulina. Através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a expressão de GLUT-12 foi identificada em glândulas mamárias, rins, intestino, baço, músculo esquelético, coração, testículo e próstata [Rogers, Macheda et al., 2002; Miller, Finucane et al., 2005]. Em células não estimuladas o GLUT-12 localiza-se em vesículas intracelulares associadas ao aparelho de Golgi e a membrana plasmática [Aemi-Flessner, Otu, Moley 2011; Stuart, Howell et al., 2009; Holman 2020], numa forma que é dependente de seu motivo dileucina. O GLUT-12 não é só um transportador de glicose, evidências apontam, também, para a função de transportar frutose e galactose, e é inibida pela citocalasina B [Rogers, Chandler et al., 2003]. O chamado motivo dileucina é encontrado tanto no N-terminal quanto no C-terminal, sendo similar ao do GLUT-8 [Flessner, Moley 2009]. O GLUT-12 é deslocado para a membrana plasmática dos tecidos em resposta a estimulação pela insulina. Esse deslocamento foi comparado ao deslocamento do GLUT-4 [Stuart, Howell et al., 2009]. O GLUT-12 é importante para o desenvolvimento fetal, particularmente do coração, uma vez que a deficiência de GLUT-12 está associada a doença cardíaca [Jimenez-Amilburu, Jong-Reaadsen et al., 2015]. Na próstata a expressão de GLUT-12 é regulada por andrógenos e no câncer de próstata seus níveis estão aumentados [White, Tsouko et al., 2018; Chandler, Williams et al., 2003].

GLUT-13

O GLUT-13 é uma proteína composta de 618 amino ácidos, tendo sido identificada como um co-transportador de H^+ mio-inositol, sendo por isso mais conhecido como HMIT (*H⁺ Myo-Inositol Transporter*), com especificidade para o transporte de mio-inositol, Inositol trifosfato e estereoisômeros relacionados [Uldry, Ibberson et al., 2001; Di Daniel, Mok et al., 2009]. Codificado pelo gene SLC2A13 é expresso predominantemente no cérebro. Na sequência de aminoácidos de HMIT é encontrado todos os motivos (*motifs*) que são considerados importantes para a atividade de transporte de glicose. Contudo o HMIT não transporta a glicose, ao contrário foi identificado como um simporte de mio-inositol acoplado a H^+ , com Km de cerca de 100 μM [DiDaniel, Mok et al., 2009]. A atividade de transporte é específica para mio-inositol e fortemente ativado pela acidificação do meio extracelular aumentando a velocidade máxima (V_{max}) sem alterar o Km. O transporte é inibido por floretina, florizina e citocalasina B [Mueckler, Thorens 2013].

GLUT-14

O GLUT-14 parece ser uma duplicação do GLUT-3, uma vez que é codificado pelo gene SLC2A3 e apresenta uma identidade sequencial de amino ácidos de 95% do GLUT-3 [Wu, Freeze 2002]. É expresso somente no testículo e pressupõe que seja um transportador de glicose e ácido dehidroascorbico.

COTRANSPORTADORES DE SÓDIO E GLICOSE

Já vimos que o movimento de glicose através da membrana plasmática, para dentro ou

para fora da célula, pode ser realizado pelos transportadores facilitativos (GLUTs), os quais operam por difusão num gradiente de concentração de glicose. Nesse processo, as concentrações da glicose, extra e intracelular se tornam iguais.

Agora, examinaremos o outro tipo de transporte de glicose via co-transportadores de sódio e glicose (SGLTs). Os SGLTs transportam a glicose (e galactose) com diferentes afinidades, através de um mecanismo secundário ativo. O gradiente eletroquímico de Na^+ provido pela bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ é utilizado para o transporte de glicose para as células contra seu gradiente de concentração [Wood, Trayhurn 2003; Wright 2001]. Considerando, que para a captação de glicose, esses transportadores funcionam com base no gradiente de concentração de Na^+ , as concentrações de glicose, dentro e fora da célula, podem ser diferentes [Wright, 2001; Wood, Trayhurn 2003]. Em humanos foram relatados os seguintes transportadores de sódio/glicose. SGLT-1 codificado pelo gene SLC5A1 e SGLT-2 codificado pelo gene SLC5A2, que são os mais estudados [Poulsen, Fenton, Rieg 2015]. O transportador SGLT-3 codificado pelo SLC5A4 é expresso em vários tecidos como intestino, fígado, rins, músculo esquelético, neurônios colinérgicos e não é considerado um SGLT funcional, parecendo atuar mais como sensor de glicose na membrana plasmática de neurônios colinérgicos [Diez-Sampedro, Hirayama et al., 2003]. O SGLT-4 codificado pelo gene SLC5A9 é expresso no intestino delgado, rins, fígado, pulmão, cérebro, traqueia, útero e pâncreas; SGLT-5 codificado pelo gene SLC5A10 é expresso somente no fígado; SGLT-6 codificado pelo gene SLC5A11 é considerado um transportador de baixa afinidade no intestino delgado [Wright, Loo, Hirayama 2011; Wright, Loo et al., 2004].

SGLT-1

O SGLT-1 codificado pelo gene SLC5A é composto de 664 amino-ácidos dispostos em 14 domínios α -hélices transmembranas, que apresentam um simples sítio de glicosilação, na alça entre as hélices 5 e 6 e dois sítios de fosforilação nas alças entre as hélices 6 e 7 e 7 e 8 [Wright, Loo, Hirayama 2011; Wright, Loo et al., 2004; Turk, Wright 1997; Sano, Shinozaki, Ohta 2020]. O modelo de sua estrutura secundária, indicando 14 α -hélices transmembranas baseia-se em estudos experimentais e computacionais [Turk, Wright 1997].

O segmento NH₂ terminal hidrofílico está localizado na face externa da membrana plasmática apresentando vários sítios de consenso para glicosilação e no entanto, não é um requisito para sua atividade. Sítio de consenso refere-se a um segmento de resíduos de aminoácidos que ocorre com muita frequência em dois ou mais polipeptídeos. O COOH terminal, também está voltado para a face externa da célula [Wright, Turk 2004]. Todos os transportadores, independente da família do gene, parecem atuar da mesma forma, isto é, alternando modelos de acesso onde a direção de transporte depende das concentrações de ligantes de cada lado da membrana, bem como, da voltagem de membrana [Hirayama, Loo, Wright 1997; Jung 2002; Loo, Hirayama et al., 1998; Wright 2001]. Através da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase, o mRNA de SGLT-1 foi detectado nos seguintes tecidos humanos: intestino delgado, músculo esquelético, fígado, coração, pulmão, traqueia, próstata, testículo, útero, estômago, tecido adiposo mesentérico, células α -pancreáticas e cérebro [Poppe, Karbach et al., 1997; Vrnovac, Balen-Eror et al., 2015; Bonner, Kerr-Conte et al., 2005]. O SGLT-1 é responsável pela absorção de glicose no intestino delgado e pela reabsorção de cerca de 3% da carga de glicose filtrada nos túbulos renais proximais [Poulsen, Fenton, Rieg 2015]. Em glândulas salivares, submandibular e parótida o SGLT-1 foi detectado [Sabino-Silva, Freitas et al. 2009; Jurysta, Nicaise et al., 2013; Cetik, Hupkens et al., 2014], provavelmente desempenhando um papel na reabsorção de glicose e água

Além do transporte de glicose a SGLT-1 apresenta outras funções biológicas, como o sensor de glicose no cérebro [Wright, Ghezzi, Loo 2017], proteção contra patógenos em linfócitos ativados [Bhasvkar, Sing et al., 2016]. O transporte de glicose pelo SGLT-1 requer o cotransporte de Na^+ com uma estequiometria de 2 Na^+ para uma molécula de glicose [Chen, Coady et al., 1995; Lee, Kanai et al., 1994]. O SGLT-1 apresenta em sua estrutura sítios de consenso para a regulação pelas proteínas quinases A (PKA) e C (PKC) [Hirsch, Loo, Wright 1998; Wright, Hirsch et al., 1997]. As proteínas quinases PKA e PKC modificam a atividade de SGLT-1 influenciando a abundância do transportador na membrana plasmática [Lang, Singh et al., 2020]. As proteínas quinases são enzimas pertencentes a classe de transferases, que catalisam a transferência de grupo fosfato para diferentes substratos contendo resíduos serina e treonina [Reikhardt, Shabanov 2020]. Alguns pontos sobre as reações catalisadas pelas proteínas quinases: (1) na reação de fosforilação, o grupo fosforila γ -terminal do ATP é transferido a resíduos de serina e treonina, (2) a desfosforilação é realizada por outra enzima, a proteína fosfatase, através da remoção hidrolítica do grupo fosforila ligado a proteínas.

Os membros da família proteína quinase C (PKC) compartilham a mesma estrutura modular. Os PKCs são classificados de acordo com seus domínios reguladores e consequentemente os segundos mensageiros que regulam suas atividades. Os PKCs convencionais PKCs (α , β , γ) contém um domínio C-1 que liga o diacilglicerol (DAG) e fosfatidil serina e um domínio C-2 que liga fosfolipídeos aniônicos incluindo o fosfatidil Inositol- 4, 5 bisfosfato numa forma dependente de cálcio [Antal, Newton 2014]. Os novos PKCs (δ , ϵ , η , θ) contém domínio C-1 que liga diacilglicerol e um novo domínio C-2 que não responde ao cálcio e não auxilia na ligação com membrana plasmática [Antal, Newton 2014].

Todas as isoenzimas têm um segmento conservado no C-terminal, que serve de sítio de atracção dependente de fosforilação para moléculas reguladoras. Além disso, todas as isoenzimas tem uma sequência que inibe o PKC, mantendo-o num estado inativo ocupando a cavidade de ligação do substrato. Essa sequência é chamada pseudo substrato. A fosforilação de PKC se reveste de muita importância: (1) para fazer o PKC numa conformação cataliticamente competente e (2) para proteger o PKC da degradação [Newton 2003]. Mesmo sendo cataliticamente competente quando fosforilado, sua atividade é inibida pelo pseudosubstrato até que o segundo mensageiro apropriado tira o pseudo substrato do sítio catalítico [Antal, Newton 2014]. Os PKCs convencionais são ativados por dois segundos mensageiros o Ca^{2+} e o diacilglicerol (DAG). A ligação de cálcio no domínio C-2 desloca a quinase até a membrana plasmática por meio de ligação hidrofóbica [Scott, Antal, Newton 2013]. Na membrana o domínio C-1 liga o diacilglicerol, um evento que fornece a energia necessária para tirar o pseudosubstrato do sítio ativo e ativar o PKC [Orr, Keranen, Newton 1992; Antal, Newton 2014].

A cinética da reação para o cotransporte sódio/glicose pode ser descrita como um esquema de reação ordenada em que dois íons Na^+ primeiro ligam ao SGLT-1, aumentando então a afinidade da proteína pela glicose. Após ligar o açúcar a proteína sofre uma alteração conformacional para liberar os dois Na^+ e a glicose para o outro lado da membrana plasmática, onde há a dissociação dos dois Na^+ . A proteína sem a carga sofre outra alteração conformacional, agora se expondo novamente aos dois substratos extracelulares [Wright, Loo et al., 2004].

SGLT-2

A proteína SGLT-2, codificada pelo gene SLC5A2 é constituída por 672 amino ácidos, apresentando o N-terminal e o C-terminal extracelulares [Turk, Wright 1997]. Expresso principalmente nos rins de roedores e de humanos, o mRNA de SGLT-2 apresenta também, baixa

expressão nas glândulas mamárias, testículo, fígado, pulmão, intestino, músculo esquelético, baço e cérebro [Wright, Loo, Hirayama 2011; Chen, Williams et al., 2010; Vrhovac, Balen-Eror et al., 2015]. O SGLT-2 pode ser regulado a nível transcricional por fatores como o fator hepatócito nuclear HNF-1-a (*Hepatocyte Nuclear Fator*), que liga a região do sítio promotor de SGLT-2 [Hirsch, Loo, Wright 1996]. Por outro lado, a análise fosfoproteômica mostrou três sítios de fosforilação, evidenciando que assim como o SGLT-1, o SGLT-2 pode ser regulado por fosforilação [Feric, Zhao et al., 2011]. Da mesma forma que o co-transportador SGLT-1, o SGLT-2 é ativado pelas proteínas quinases A e C. Em células embrionárias renais, foi observado que a ativação de SGLT-2 pelo PKA e PKC aumentou a captação de glicose em 225 e 150% respectivamente [Ghezzi, Wright 2012]. Os efeitos das proteínas quinases A e C podem estar relacionados a taxa de fusão das vesículas com a membrana plasmática. Diferentemente do transporte de glicose pelo SGLT-1, em que a estequiometria é de 2 Na⁺ para uma molécula de glicose, para o SGLT-2 a relação é de 1:1 [Kanai, Lee et al., 1994; Wright, Loo, Hirayama 2011]. Nos rins o SGLT-2 localiza-se na membrana apical do túbulo contorcido proximal (segmento S1) [You, Lee 1995], onde intermedia a absorção da maior parte da glicose presente no filtrado glomerular [Kanai, Lee et al., 1994; Vallon, Platt et al., 2011]. Em condições euglicêmicas os rins funcionam filtrando cerca de 180 g de glicose por dia [Wright 2001]. Desses 180 g, 90% (162 g) são reabsorvidos no segmento S1 dos túbulos contorcidos proximais pelo SGLT-2, que apresenta baixa afinidade e alta capacidade de transporte. Os restantes 10% (18 g) são reabsorvidos nos segmentos S2 e S3 dos túbulos contorcidos proximais através do transportador SGLT-1, o qual apresenta alta afinidade e baixa capacidade de transporte, de modo que, em circunstâncias normais toda a glicose filtrada é reabsorvida [Wright, Hirayama, Loo 2007; Harada, Inagaki 2012]. Se a carga de glicose aumenta, a reabsorção de glicose também aumenta, porém até atingir o limiar renal (10-11 mmol/L) [Poudel 2013; DeFronzo, Davidson 2012]. Quando o limiar renal é ultrapassado, o transportador SGLT-2 fica saturado causando assim a glicosúria [Chao 2012; Steen, Goldenberg 2017].

SGLT-3

O SGLT-3 humano, codificado pelo gene SLC5A4 foi detectado principalmente em tecidos como intestino, fígado, rins e músculo [Kong, Yet, Lever 1993]. Mais tarde a expressão de SGLT-3 foi descrita nos neurônios entéricos do epitélio intestinal e na junção neuromuscular do músculo esquelético [Diez-Sampedro, Hirayama et al., 2003]. Quando expresso em *Xenopus* oócitos a proteína SGLT-3 mostrou uma incapacidade de transportar a glicose, por outro lado, a ligação induz correntes através de despolarização do potencial de membrana plasmática mediada pela glicose [Diez-Sampedro, Hirayama et al., 2003; Gyimesi, Pujol-Gimenez et al., 2020]. Tendo-se em vista que a despolarização de membrana plasmática foi uma função linear da glicose no intervalo da concentração fisiológica, foi sugerido que a variação da concentração de glicose plasmática modula o potencial de membrana nos neurônios colinérgicos do sistema entérico e na junção neuromuscular do músculo esquelético. Dessa forma o SGLT-3 pode atuar como um sensor de glicose transmitindo informações à célula a respeito da concentração de glicose externa diretamente através do potencial de membrana ou indiretamente acoplado a outra molécula como proteína G [Diez-Sampedro, Hirayama et al., 2003; Scheepers, Joost, Schurman 2004; Gyimesi, Pujol-Gimenez G et al., 2020]. A corrente induzida pelo substrato (glicose) através de SGLT-3 é dependente de Na⁺, aumenta na presença de H⁺ e é especificamente inibida pela florizina [Diez-Sampedro, Hirayama et al., 2003].

A florizina é um glicosídeo fenólico, encontrado em árvores como macieiras e tem sido usado como uma ferramenta para pesquisa fisiológica. Sua principal ação farmacológica é a de produzir glicosúria renal e bloquear a absorção intestinal de glicose inibindo o cotransportador

sódio/glicose [Ehrenkranz, Lewis NG et al., 2005].

SGLT-4

O transportador SGLT-4 humano, codificado pelo gene SLC5A9 é expresso principalmente no intestino e nos rins [Tazawa, Yamato et al., 2005]. Estudos funcionais com células que expressam o SGLT-4 em excesso mostrou que o transporte de α -metil glicopiranosídeo (α -MG) é dependente de sódio. Além disso, o transporte de α -MG foi inibido pela manose e glicose e em menor extensão pela frutose. O fato da captação de manose pelo SGLT-4 e a capacidade da manose de inibir o transporte de α -MG indicou que o SGLT-4 é um transportador de manose acoplado ao sódio [Tazawa, Yamato et al., 2005; Gyimesi, Pujol-Gimenez et al., 2020].

SGLT-5

Codificado pelo gene SLC5A10, este transportador SGLT-5 é expresso em rins humanos. Estudos funcionais usando células que expressam a proteína em excesso, mostraram que a proteína transporta manose com uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de 0,45 mM e a frutose um K_m 0,62 mM, e apresenta características funcionais típicas dos membros da família SLC5, isto é, inibição pela florizina e transporte dependente de Na^+ [Gremper, Augustin et al., 1012]. O SGLT-5 é responsável pela reabsorção da manose e da frutose no filtrado glomerular, sendo essa reabsorção bloqueada pela florizina [Gonzalez-Vicente, Cabral et al., 2019]. Variações genéticas de SGLT-5 estão associadas ao comprometimento dos níveis sanguíneos de 1,5 anhydro glucitol (1,5 AG) [Li, Maruthur et al., 2017]. 1,5 AG é uma forma deoxi da glicose de ocorrência natural, apresentando uma estrutura de anel pirano, que confere estabilidade metabólica.

O 1,5 AG é um poliol derivado de fontes dietéticas, encontrado em concentrações constantes no sangue em estado glicêmico normal. Aproximadamente de 500 a 1.000 mg de 1,5 AG existem no corpo humano na sua forma livre [Yamanouche, Tachibana et al., 1992; Ikeda, Hiro 2009]. A concentração de 1,5 AG sérico, diminui rapidamente quando o nível de glicose excede o limiar renal, na excreção pela urina, sendo então, um marcador do estado glicêmico de curto prazo [Yamanouche, Tachibana et al., 1994; Dungan, 2008]. Assim, quando o nível de 1,5 AG for baixa, indica um estado de baixo controle glicêmico. O teste de 1,5 AG comumente é aceito para medir os níveis desse composto, com a finalidade de determinar a história de episódios hiperglicêmicos, complementar aos testes de hemoglobina glicada, Hb1C e o de frutossamina [Gyimesi, Pujol-Gimenez et al., 2020].

BIBLIOGRAFIA GERAL

Devlin TM (editor). Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. 7Th edition John Wiley & Sons, Inc. 2011.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (editors). Biochemistry. 5Th edition W. H. Freeman and Company. New York. 2002

Voet D, Voet JG (editors). Biochemistry. 2end edition. John Wiley & Sons, Inc 1995

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Aemi-Flessner LB, Otu MC, Moley KH 2011. The amino acid upstream of NH₂-terminal dileucine motif play a role in regulating the intracellular sorting of the class III transporters GLUT-8 and GLUT-12. *Mol Membr Biol* 28: 30-41.

Actis Dato V, Chiabrando GA 2018. The role of low density lipoprotein receptor related protein-1 in lipid metabolism, glucose homeostasis and inflammation. *Int J Mol Sci* 19: 1780 doi 10.3390/ijms19061780.

Adelman RC, Ballard PJ, Weinhouse S 1967. Purification and properties of rat liver fructokinase. *J Biol Chem* 242: 3360-5.

Akash MS, Rehman K, Chen S 2013. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem* 114: 525-31.

Akhurst RJ, Hata A 2012. Targeting the TGF β signalling in disease. *Nat Rev Drug Discov* 11: 790-811.

Al-Hasani H, Kunamneni RK, Dawson K et al., 2002. Roles of N and C termini of GLUT-4 in endocytosis. *J Cell Sci* 115: 131-40.

Angyal SJ 1984. The composition of reducing sugars in solution. *Adv Carbohydrate Chem Biochem* 42:15-68.

Antal CE, Newton AC 2014. Tuning the signaling output of protein kinase C. *Biochem Soc Trans* 42: 1477- 83.

Antonescu CN, Thon FSL, Niu W, Karnell E, Klip A 2005. To be or not to be: regulation of the intrinsic activity of GLUT-4. *Curr Med Chem Immunol Endo Metab Agents* 5: 175-87.

Arbuckle M, Kane S, Porter LM, Scatter MJ, Gould GW 1996. Structure function analysis of liver type (GLUT-2) and brain type (GLUT-3) glucose transporters: expression of chimeric transporters in *Xenopus* oocytes suggest an important role for putative transmembrane Helix 7 in determining substrate selectivity. *Biochemistry* 35: 16519-27.

Asano T, Katagiri H, Takata T et al., 1991. The role of N-glycosylation of GLUT-1 for transport activity. *J Biol Chem* 266: 24632-6.

Augustin R, Carayannopoulos MO, Dows LO et al., 2004. Identification and characterization of human glucose transporter -like protein-9 (GLUT-9): an alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem* 279: 16229-36.

Augustin R 2010. The protein family of glucose transport facilitators: its not only about after all. *IUBMB Life* 62: 315-33.

Baque S, Montell E, Camps M et al., 1998. Overexpression of glycogen phosphorylase increases GLUT-4 expression and glucose transport in cultured skeletal human muscle. *Diabetes* 47: 1185-92.

- Barcelona PF, Luna JD, Chiabrando GA et al., 2010 Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptor related protein-1 and α 2-macroglobulin in retinal and choroidal tissue of proliferative retinopathies. *Exp Eye Res* 91: 262-74.
- Barnett TE, Holman GD, Chalkley RA, Munday KA 1975. Evidence for two asymmetric conformational states in the human erythrocyte sugar transport system. *Biochem J* 145:417-29.
- Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A 2016. Xanthine oxidoreductase derived reactive species: physiological and pathological effects. *Oxid Med Cell Longev* 2016 article ID 3527579.
- Bhavsar SK, Singh Y, Sharma P et al., 2016. Expression of JAK-3 sensitive Na⁺ couple glucose carrier SGLT-1 in activated cytotoxic T lymphocytes. *Cell Physiol Biochem* 39: 1209-28.
- Bibee KP, Augustin R, Gazit V, Moley KH 2013. The apical sorting signal for human GLUT-9 resides in the N-terminus. *Mol Cell Biol* 376: 163-73.
- Bibert S, Hess SK, Firsov D et al., 2009. Mouse GLUT-9: evidences for a urate transporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F 612-9.
- Blodgett DM, Carruthers A 2005. Quench-flow analysis reveals multiple phases of GLUT-1 mediated sugar transport. *Biochemistry* 44: 2650-60.
- Blondeau N, Beraud-Dufour S, Lebrun P et al., 2019. Sortilin in glucose homeostasis: from accessory protein to key player. *Front Pharmacol* 9, article 1561 doi 10. 3389.
- Bogan JS 2012. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem* 81: 507-32.
- Bondy CA, Lee W, Zhou J 1992. Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Mol Cell Neurosci* 3: 305-14.
- Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V et al., 2015. Inhibition of the glucose transporter SGLT-2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med* 21: 512-7.
- Borst SE 2004. The role of TNF- α in insulin resistance. *Endocrine* 23: 177-82.
- Borst SE, Bagby GJ 2002. Neutralization of tumor necrosis factor reverses age-induced impairment of insulin responsiveness in skeletal muscle of Sprague-Dawley rats. *Metabolism* 51: 1061-4.
- Bryant NJ, Govers R, James DE 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT-4. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3: 267-77.
- Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO 1992. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine GLUT-5 *J Biol Chem* 267: 14523-6.
- Burcelin R, Dolci W, Thorens B 2000. Glucose sensing by hepatportal sensor is GLUT-2 dependent: in vivo analysis in GLUT-2 null mice. *Diabetes* 49: 1643-8.

Camps M, Castello A, Munoz P et al., 1992. Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle fat) glucose transporter expression. In insulin sensitive in heart, red and white muscle. *Biochem J* 282: 765-72.

Carruthers A, DeZutter J, Ganguly A, Devaskar SU 2009. Will the original glucose transporter isoform please stand up. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E 836-48.

Caruana BT, Byrne FL, Knights AJ, Quinlan KGR, Hoen KL 2019. Characterization of glucose transporter 6 in lipopolysaccharide induced bone marrow derived macrophage functions. *J Immunol* 202: 1826-32.

Cetic S, Hupkens E, Malaisse WJ, Sener A, Popescu JR 2014. Expression and localization of glucose transporters in rodent submandibular salivary glands. *Cell Physiol Biochem* 33: 1149-61.

Chadt A, Al-Hasani H 2020. Glucose transporters in adipose tissue, liver and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 472: 1273-98.

Chai SY, Gutierrez-de-Teran H, Stratikos E 2021. Editorial: Physiological, pathological roles and pharmacology of insulin regulated aminopeptidase. *Front Mol Sci* 8: 1-3 doi 10.3389/fmolb.2021.685101.

Chandler JD, Williams ED, Slavin JL, 2003. Expression and localization of GLUT-1 and GLUT-12 in prostate carcinoma. *Cancer* 97: 2035-42.

Chao E 2012. Dapagliflozin: an evidence based review of its potential in the treatment of type 2 diabetes. *Core Evid* 7: 21-8.

Chaudhari K, Malhotra K, Sowers J, Aroora A 2013. Uric acid-key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome. *Cardiorenal Med* 3: 208-20.

Cheeseman C 2008. GLUT-7: a new intestinal hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol metab* 295: E238-41.

Chen XZ, Coady MJ, Jackson F, et al., 1995. Thermodynamic determination of glucose coupling ratio for human SGLT-1 cotransporter. *Biophys J* 69: 2405-14.

Chen J, Williams S, Ho S et al., 2010. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT-2 gene and related family members. *Diabetes Ther* 1: 57-92.

Chen F, Lai J, Zhu Y et al., 2020. Cardioprotective effect of decorin in type 2 diabetes. *Front Endocrinol* 2020 doi 10.3389/fendo.2020.479258.

Choi BY 2019. Biochemical basis of anticancer effects of phloretin. A natural dihydrochalcone. *Molecules* 24: 278:doi 103390/molecules.24020278.

Coster AC, Govers R, James DE 2004. Insulin stimulates the entry of GLUT-4 into the endosomal recycling pathway by a quantal mechanism. *Traffic* 5: 763-71.

Coucke PJ, Willaert A, Wessels MW et al., 2006. Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT-10 alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat Genet* 38: 452-7.

Cura AJ, Carruther A 2012. The role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism and homeostasis. *Compr Physiol* 2: 863-914.

Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC et al., 2001. Sequence and functional analysis of GLUT-10: a glucose transporter in the type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab* 74: 186-99.

DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, et al., 1981. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30: 1000-7.

De Fronzo RA, Ferrannini E, Sato Y, et al., 1991. Sinergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J Clin Invest* 68: 1468-74.

DeFronzo RA, Davidson JÁ, Del-Prato S 2012. The role of kidney in glucose homeostasis. A new path towards normalizing glycemia. *Diabetes Obes Metab* 14: 5-14.

Deng D, Xu C, Sun P et al., 2014. Crystal structure of human glucose transporter GLUT-1. *Nature* 510: 121-5.

Dentin R, Denechaud FD, Benhamed F et al., 2006. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 136: 1145-9.

Devaskar S, Zham DS, Holtzclaw L et al., 1991. Developmental regulation of the distribution of rat brain insulin insensitive (GLUT-1) glucose transporter. *Endocrinol* 129: 1530-40.

Devraj K, Klinger ME, Myers RL et al., 2011. GLUT-1 glucose transporters in the blood brain barrier: differential phosphorylation. *J Neurosci Res* 89: 1913-25.

DiDaniel E, Mok MH, Mead E et al., 2009. Evaluation of expression. and function of the H⁺/myo-inositol transporter HMIT. *BMC Cell Biol* 10.54 doi 10.1186/1471-2121-10-5.

Diez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C et al., 2003. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11753-8.

Diggle CP, Shires M, Leitch D et al., 2009. Ketohexokinase: expression. and localization of the principal fructose metabolism enzyme. *J Histochem Cytochem* 57: 763-74.

Doege H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A 2000. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT-9) a novel member of the family of sugar transport facilitators predominantly expressed in brain and leukocytes. *Biochem J* 350 (Pt 3): 771-6.

Dungan KM 2008. 1,5 anhydro glucitol (glyco Mark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. *Expert Rev Mol Diagn* 8: 9-19.

Ehrenkranz JRL, Lewis NG, Kahn CR, Roth J 2005. Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev* 21: 31-8.

Enogieru OJ, Ung PMU, Yee SW et al., 2019. Functional and structural analysis of rare SLC2A2 variants associated with Fanconi-Bickel syndrome and metabolic traits. *Hum Mutat* 40: 983-95.

- Estrada DE, Elliott E, Zinman B et al., 1994. Regulation of glucose transport and expression of GLUT-3 transporters in human circulating mononuclear cells: studies in cells from insulin dependent diabetes and non diabetic individuals. *Metabolism* 43: 591-8.
- Evans AS, Doblado M, Chi MM, Corbett JÁ, Moley KH 2009. Facilitative glucose transporter 9 expression affects glucose-sensing in pancreatic β cells. *Endocrinol* 150: 5302-10.
- Feng XH, Derynck R 2005. Specificity and versatility in TGF- β signaling through SMADS. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 653-93.
- Feric M, Zhao B, Hoffert JD et al., 2011. Large scale phosphoproteomic analysis of membrane proteins in renal proximal and distal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: C 755-70.
- Ferraris RP, Diamond J 1997. Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev* 77: 257-302
- Ferraris RP, Choe JY, Patel CR 2019. Intestinal absorption of fructose. *Annu Rev Nutr* 38: 41-67.
- Flessner LB, Moley KH 2009. Similar [DE]XXXL[LI] motif differentially target GLUT-8 and GLUT-12 in chinese hamster ovary cells. *Traffic* 10: 324-33.
- Fu Y, Mayanu L, Bert BR, Garvey NT 2004. Facilitative glucose transporter gene expression. In human lymphocytes, monocytes and macrophage: a role for GLUT foam cell formation. *Blood Cell Mol Dis* 321: 182-90.
- Fueger PT, Searer J, Bracy DP et al., 2005. Control of muscle glucose uptake: test of the rate limiting step paradigm in conscious, unrestrained mice. *J Physiol* 562: 925-35.
- Fukumoto H, Seino S, Imura H et al., 1988. Sequence tissue distribution and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5434-8.
- Gawlik V, Schmidt S, Scheepers A et al., 2008. Targeted disruption of SLC2A8 (GLUT-8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. *Mol Membr Biol* 25: 224-35.
- Geck P, Heinz E 1989. Secondary active transport: introductory remarks. *Kidney Int* 36:334-41.
- Ghezzi C, Wright EM 2012. Regulation of the human Na⁺ dependent glucose cotransporter hSGLT-2. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C 348-54.
- Gonias SL, Campana WM, 2014. LDL receptor related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer and injury to the nervous system. *Am J Pathol* 184: 18-27.
- Gonzalez-Vicente A, Cabral PD, Hong NJ et al., 2019. Fructose reabsorption by rat cotransporters: role of Na⁺ linked cotransporters and the effect of dietary fructose. *Am J Physiol Renal Physiol* 316: F 473-80.
- Gorga FR, Lienhard GE 1982. Changes in the intrinsic fluorescence of the human erythrocyte monosaccharide transporter upon ligand binding. *Biochemistry* 21: 1905-8.

Gould GW, Thomas HM, Jess TJ et al., 1991. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes. Kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver and brain isoforms. *Biochemistry* 30: 5139-45.

Govers R, Coster AC, James DF 2004. Insulin increases cell surface GLUT-4 into a cell surface recycling pathway. *Mol Cell Biol* 24: 6456-66.

Govers R 2014. Molecular mechanism of GLUT-4 regulation in adipocytes. *Diabetes Metab* 40: 400-10.

Gray AM, Mason AJ 1990. Requirement for activin A and transforming growth B pro regions in homodimer assembly. *Science* 247: 1328-30.

Gremper R, Augustin R, Froehner S et al., 2012. Functional characterization of human SGLT-5 as a novel kidney specific sodium dependent sugar transporter. *FEBS Lett* 586:248—53.

Guillam MT, Burcelin R, Thorens B 1998. Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT-2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12317-21.

Gyimesi G, Pujol-Gimenez J, Kanai Y, Hediger MA 2020. Sodium coupled glucose transport the SLC5 family, and therapeutically relevant inhibitors from molecular discovery to clinical application. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 472: 1177-206.

Harada N, Inagaki N 2012. Role of sodium glucose transporters in glucose uptake of the intestine and kidney. *J Diabetes Invest* 3: 352-3.

Harik SI, Kalaria RN, Andersson L et al., 1990. Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. *J Neurosci* 10:3862-72

Hassel B, Elsaï A, Froland AS et al., 2015. Update and metabolism of fructose by rat cortical cells in vivo and by isolated nerve terminals in vitro. *J Neurochem* 133: 572-81.

Hirayama BA, Loo DDF, Wright EM 1997. Cation effects on protein conformation and transport in the Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem* 272: 2110-5.

Hirsch JR, Loo DDF, Wright EM 1996. Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression. by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 271: 14740-6.

Holman GD, Lo-Leggio L, Cushman SW 1994. Insulin stimulated GLUT-4 glucose transporter recycling. A problem in membrane protein subcellular trafficking through multiple pools *J Biol Chem* 269: 17516-24.

Holman GD 2020. Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 472: 1155-75.

Hou JC, Suzuki N, Pessin JE, Watson RT 2006. Specific dileucine motifs for the GGA dependent entry of newly synthesized insulin responsive aminopeptidase into the insulin responsive compartment. *J Biol Chem* 281: 33457-66.

- Huang S, Czech M 2007. The GLUT-4 transporter. *Cell Metab* 5: 237-52.
- Hundal HS, Egan PC, Neuper PD et al., 1992. Biochemical and immunocytochemical localization of the GLUT-5 glucose transporter in human skeletal muscle. *Biochem J* 286: 339-43.
- Hwang DY, Ismail-Beigi F 2006. Control of GLUT-1 promoter activity under basal conditions and in response to hyperosmolarity: role of Sp-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C 337-44.
- Ibberson M, Uldry M, Thorens B 2000. GLUTX1 a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin sensitive tissues. *J Biol Chem* 275: 4607-12.
- Ikeda N, Hiro Y 2019. Cardiovascular disease and 1,5 anhydro -D-Glucitol. *Global Health Med* 1: 83-7
- Iozzo RV, 1999. The biology of small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 274: 18843-6.
- Jedrychowski MP, Gartner CA, Gygi SP et al., 2010. Proteomic analysis of GLUT-4 storage vesicles reveals LRP-1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. *J Biol Chem* 285: 104-14.
- Jimenez-Amilburu V, Jong -Raadsen S, Bakkers J et al., 2015. GLUT-12 deficiency during early development results in heart failure and a diabetic phenotype in zebrafish. *J Endocrinol* 224: 1-15.
- Johnson JH, Newgard CB, Milburn JL et al., 1990. The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 265: 6548-51.
- Johnson AO, Subtil A, Petrush R et al., 1998. Identification of an insulin-responsive slows endocytic recycling mechanism in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 273: 17968-77.
- Johnson AO, Lampson MA, McGraw TE 2001. A dileucine sequence and a cluster of acid amino acids are required for dynamic retention in the endosomal recycling compartment of fibroblast. *Mol Biol Cell* 12: 367-81.
- Joost HG, Thorens B 2001. The extended GLUT family of sugar/polyol transport facilitators- nomenclature, sequence, characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Bio* 18:247-56.
- Jovic M, Sharma M, Rahajen J, Caplan S 2012. The Early endosome: a busy sorting station for protein at the crossroads. *Histol Histopathol* 25: 99-112.
- Jung H 2002. The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. *FEBS Lett* 529: 73-7.
- Jung M, Triebel S, Anke T et al., 2009. Influence of apple polyphenol on inflammatory gene expression. *Mol Nutr Food Res* 53: 1263-80.
- Jurysta C, Nicaise C, Giroix MH et al., 2013. Comparison of GLUT-1, GLUT-2, GLUT-4 and

SGLT-1 mRNA expression. in salivary glands and six other organs of control, streptozotocin-induced and Goto-Kakizaki diabetic rats. *Cell Physiol Biochem* 31: 37-43.

Kahm JY, Rajakumar RA, McKnight RA et al., 1999. Developmental regulation of genes mediating murine brain glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiology* 276: R892-900.

Kanai Y, Lee WS, You G et al., 1994. The human kidney low affinity Na⁺/glucose transporter SGLT-2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest* 93: 397-404.

Kandror KV, Pilch PF 2011. The sugar is sIRV: sorting GLUT-4 and its fellow travelers. *Traffic* 12: 665-71.

Kandror K, Pilch PF 1994. Identification and isolation of glycoprotein that translocate to the cell surface from GLUT-4 enriched vesicles in an insulin dependent fashion. *J Biol Chem* 269: 138-42.

Karylowski O, Zeigerer A, Cohen A, McGraw TE 2004. GLUT-4 is retained by an intracellular cycle formation with endosomes. *Mol Biol Cell* 15: 870-82.

Katsanos GS, Anagianaki A, Castellani ML et al., 2008. Biology of neurotensin: revisited study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21:255-9.

Kauzman W 1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem* 14: 1-59.

Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL et al., 1988. Evidence for a family of human glucose transporter like proteins: sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263: 15245-8.

Kayano T, Burant CF, Fukumoto H et al., 1990. Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization and gene localization of cDNA encoding an isoform (GLUT-5) expressed in small intestine, kidney, muscle and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudo-gene-like sequence (GLUT-6). *J Biol Chem* 265:13276-82.

Keller SR, Scott H, Mastick CC et al., 1995. Cloning and characterization of a novel insulin regulated membrane aminopeptidase from GLUT-4 vesicles. *J Biol Chem* 270: 23612-8.

Keller SR, Davis AC, Clairmont KB 2002. Mice deficient in the insulin regulated membrane amino peptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT-4 level but maintain normal glucose homeostasis. *J Biol Chem* 277: 17677-86.

Keller SR 2004. Role of the insulin regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes. *Biol Pharm Bull* 27: 761-4.

Kern M, Wells JÁ, Stephens P et al., 1990. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporters (GLUT-4) protein level. *Biochem J* 282:765-72.

Kitbabgi P 2007. Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Curr Opin Drug Discov Develop* 5: 764-76.

- Kong CT, Yet SF, Lever JE 1993. Cloning and expression. of mammalian Na⁺ amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺ glucose cotransporter. *J Biol Chem* 268: 11509-12.
- Lang F, Singh Y, Salker MS et al., 2020. Glucose transport in lymphocytes. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 472: 1401-6.
- Larance M, Ramm G, Stockli J et al., 2005. Characterization of the Rab GTPase activating protein as 160 in insulin regulated GLUT-4 trafficking. *J Biol Chem* 280: 37803-12.
- Lee YC, Huang HY, Cheng CH, Chen YT 2010. Mitochondrial GLUT-10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Hum Mol Genet* 19: 3721-33.
- Lee WS, Kanai Y, Wells RG, Hediger MA 1994. The high affinity Na⁺-glucose cotransporter. Reevaluation of function and distribution of expression. *J Biol Chem* 269: 12032-9.
- LeFevre PG 1948. Evidence of active transfer of certain non electrolyte across the human red cell membrane. *J Gen Physiol* 31: 505-27.
- LeFevre PG, LeFevre ME 1952 The mechanism of glucose transfer into and out of the human red cell. *J Gen Physiol* 35: 891-906.
- Leino RL, Gerhard DZ, van Bueren AM et al., 1997. Ultrastructure localization of GLUT-1 and GLUT-3 glucose transporters in rat brain. *J Neurosci Res* 49: 617-26.
- Leitch JM, Carruthers A 2009. $\alpha\alpha$ and $\beta\beta$ monosaccharide transport in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C 151-61.
- Li DT, Habtemichael EM, Julca O et al., 2019. GLUT-4 storage vesicles: specialized organelles for regulated trafficking. *Ale J Biol Med* 92: 453-70.
- Li Q, Manolescu A, Ritzel M et al., 2004. Cloning and functional characterization of the human GLUT-7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G236-42.
- Li M, Maruthur NM, Loomis SJ et al., 2017. Genome wide association study of 1,5 anhydro glucitol identifies novel genetic loci linked to glucose metabolism. *Sci Rep* 7: 2812 doi.org 10.1038/s 41598-017-02287.
- Lin S, Spudich JA 1974. Biochemical studies in the mode of action of cytochalasin. Cytochalasin B binding to red cell membrane in relation to glucose transport. *J Biol Chem* 249: 5778-83.
- Lin S, Spudich JA 1974. On the molecular basis of action of cytochalasin B. *J Supramol Struct* 2: 728- 36.
- Lisinski I, Schurmann A, Joost HG, Cushman SW, Al-Hasani H 2001. Targeting of GLUT-6 (former GLUT-9) and Glut-8 in rat adipose cells. *Biochem J* 358: 517-22.
- Liu CC, Hu J, Tsai CW et al., 2015. Neuronal LRP-1 regulates glucose metabolism and insulin signaling in the brain. *J Neurosci* 35: 5851-9.

Liu N, Xu H, Sun Q et al., 2021. The role of oxidative stress in hyperuricemia and xanthine oxidoreductase (XOR) inhibitors. *Oxid Med Cell Longev* 2021, article 147038.

Livingstone C, James DE, Rice JE, Hampeter D, Gould GW 1996. Compartment ablation analysis of the insulin responsive glucose transporter (GLUT-4) in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 315: 487-95.

Lizonov VA, Matsumoto H, Zimmerberg J et al., 2005. Insulin stimulates the halting, tethering and fusion of mobile GLUT-4 vesicle in rat adipose cells. *J Cell Biol* 169: 481-9.

Loo DDF, Hirayama BA, Gallardo EM et al., 1998. Conformational changes couple Na⁺ and glucose transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7789-94.

Maedera S, Mizuno T, Ishiguro H et al., 2019. GLUT-6 a lysosomal transporter that is regulated by inflammatory stimuli and modulates glycolysis in macrophage. *FEBS Lett* 593: 195-208.

Maiulo J, Oppedisano F, Gratteri S et al., 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol* 213: 8-14.

Manolescu A, Salas-Burgos AM, Fischbarg J, Cheeseman CI 2005. Identification of a hydrophobic residue as a key determinant of fructose transport by facilitative hexose transporter SLC2A7 (GLUT-7). *J Biol Chem* 280: 42978-83.

Manolescu AR, Witkowski KA, Klinnard A et al., 2007. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology* 22: 234-40.

Manolescu AR, Augustin R, Moley K, Cheeseman C 2007. A highly conserved hydrophobic motif in exofacial vestibule of fructose transporting SLC2A proteins acts a critical determinant of their substrate selectivity. *Mol Membr Biol* 24: 455-63.

Manolescu A, Salas-Burgos AM, Fischbarg J, Cheeseman CI 2005. Identification of hydrophobic residue as a key determinant of fructose transport by the facilitative hexose transporter SLC2A7 (GLUT-7). *J Biol Chem* 280: 42978-83.

Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A et al., 2007. Glucose transporter expression of plasma membrane of resting and activated White blood cells. *Eur J Clin Invest* 37: 282-90.

Marette A, Richardson JM, Ramal T et al., 1992. Abundance, localization and insulin induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am J Physiol* 263: C 443-52.

Martin OJ, Lee A, McGraw TE 2006. GLUT-4 distribution between the plasma membrane and the intracellular compartment is maintained by insulin modulated bipartite dynamic mechanism. *J Biol Chem* 281: 484-90.

Martinez F, Cifuentes M, Tapia JC, Nualart F 2019. The median eminence as the hypothalamic area involved in rapid transfer of glucose to brain: functional and cellular mechanism. *J Mol Membr (Berl)* 97: 1085-07.

Massague J 2000. How cells read TGF β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-78.

- Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE 1994. Characterization of a major protein in GLUT-4 vesicles. Concentration in the vesicles and insulin stimulated translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem* 269: 6089-92.
- Mazella J, Chabry J, Zsurer N, Vincent JP 1989. Purification of neurotensin receptor from mouse brain affinity chromatography. *J Biol Chem* 264: 5559-63.
- Mazella J, Zsurer N, Navarro V et al., 1998. The 100 KDa neurotensin receptor is gp 95/sortilin, a non G protein coupled receptor. *J Biol Chem* 273: 26273-6.
- McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD 2006. AKAP signaling complexes getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med* 12: 317-23.
- McVie_Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT 2001. Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters SLC2A10 (GLUT 10) localized on chromosome 20q 13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 72:113-7.
- Michau A, Guillemain G, Grosfeld A et al., 2013. Mutations in SLC2A2 gene reveal hGLUT-2 function in pancreatic β cells development. *J Biol Chem* 288: 31080-92.
- Miller PJ, Finucane KA, Hughes M, Zhao FQ 2005. Cloning and expression. of bovine glucose transporter 12. *Mamm Genome* 16: 873-83.
- Morgello S, Uson RR, Schuartz EJ, Haber RS 1995. The human blood brain barrier glucose transporter (GLUT-1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia* 14: 43-54.
- Mpakali A, Saridakis E, Harlos K et al., 2017. Ligand induced conformational change of insulin regulated aminopeptidase: insights on catalytic mechanisms and active site plasticity. *J Med Chem* 60: 2963-72.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin AS et al., 1985. Sequence and structure of human glucose transport. *Science* 229: 941-5.
- Mueckler M, Makepeace C 2006. Transmembrane segment 12 of the GLUT-1 glucose transporter is an outer Helix and is not directly involved in the transport mechanism *J Biol Chem* 281: 36993-8.
- Mueckler M, Thorens B 2013. The SLC 2 (GLUT) family of membrane transporter. *Mol Asp Med* 34: 121-38.
- Naftalin RJ 2010. Reassessment of models of facilitated transport and cotransport. *J Membr Biol* 234: 75-112.
- Neverisky DL, Abott GW 2015. Ion channel transporter interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 51: 257-67.
- Newton AC 2003. Regulation of A,B,C kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370:361-71.
- Nishino T, Okamoto K, Eger BT et al., 2008. Mammalian xanthine oxidoreductase-mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS Lett* 275: 3278-89.

- Nomura N, Verdon G, Kang HJ et al., 2015. Structure and mechanism of mammalian fructose transporter GLUT 5. *Nature* 526: 397-400.
- Ogan JS 2012. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem* 81:507-32.
- Old LJ 1988. Tumor necrosis factor. *Sci Am* 258: 59-60.
- Orr JW, Keranen LM, Newton AC 1992. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol production. *J Biol Chem* 267: 15263-6.
- Pantaleon RW, Harvey MB, Pascoe WS et al., 1997. Glucose transporter GLUT-3: ontogeny targeting and role in the mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3795-800.
- Petersen CM, Elgaard L, Nykjaer A et al., 1996. The receptor associated protein (RAP) binds calmodulin and is phosphorylated by calmodulin dependent protein kinase II. *EMBO J* 15: 4165-73.
- Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A et al., 1997. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 272: 3599-605.
- Phay JE, Hussain HB, Moley JF 2000. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family SLC2A9 (GLUT-9). *Genomics* 66: 217-20.
- Piper RC, Tai C, Kusza P et al., 1993. GLUT-4 NH₂-terminus contains a phenylalanine-based targeting motif that regulates intracellular sequestrations. *J Cell Biol* 121: 1221-31.
- Poppe R, Karbach U, Gambarian S et al., 1997. Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT-1 in neurons. *J Neurochem* 69: 84-94.
- Poudel RR 2013. Renal glucose handling in diabetes and sodium glucose cotransporter 2 inhibition. *Indian J Endocrinol Metab* 17: 588-93.
- Poulsen SB, Fenton RA, Rieg T 2015. Sodium-glucose cotransport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 24: 463-9.
- Rayner DV, Thomas ME, Trayhurn P 1994. Glucose transporters (GLUT-1-4) and their mRNAs in region rat brain: insulin-sensitive transporters expression in cerebellum. *Canadian J Physiol Pharmacol* 72: 476-9.
- Rehman K, Akash MS 2016. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance. How are they interlinked. *J Biomed Sci* 23: 87 doi 10. 1186.\
- Reikhardt BA, Shabanov PD 2020. Catalytic subunit of PKA as a prototype of the eukaryotic protein kinase family. *Biochemistry* 85: 409-24.
- Rogers S, Macheda ML, Docherty SE et al., 2002. Identification of a novel glucose transporter-like protein GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: F733-8.

- Rogers S, Chandler AL, Petrou S, Best JD 2003. Glucose transporter GLUT-12, functional characterization in *Xenopus* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 422-6.
- Rubin BR, Bogan JS 2009. Intracellular retention and insulin stimulated mobilization of GLUT-4 glucose transporter. *Vitam Horm* 80: 155-81.
- Sabino-Silva R, Freitas HS, Lamers ML et al., 2009. Na⁺-glucose cotransporter SGLT-1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow. *J Membr Biol* 228: 63-9.
- Sadiq HF, Das UG, Tracy TF, Devaskar SU 1999. Intra-uterine growth restriction differentially regulates perinatal brain and skeletal muscle glucose transporters. *Brain Res* 823: 96-103.
- Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT et al., 1996. The expression of TNF-alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 1111-6.
- Sanchez-Lozada LG, Soto Y, Tapia E et al., 2008. Role of oxidative stress in renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F 1134-41.
- Sandoval-Muniz RJ, Vargas-Guerrero B, Flores-Alvarado LJ, Gurrola-Diaz CM 2016. Gucotransportadores (GLUT): aspectos clínicos, moleculares y geneticos. *Gac Med Mex* 152: 547-57.
- Sano R, Shinozaki Y, Ohta T 2020. Sodium glucose cotransporters: functional properties and pharmaceutical potential. *J Diabetes Invest* 11: 770-8.
- Santalucia T, Boheler KR, Brand NJ et al., 1999. Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem* 274: 17626-34.
- Scheepers A, Joost AG, Schurman A 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: Molecular basis of normal and aberrant function. *J Parent Enter Nutr* 28: 364-70.
- Scheepers A, Schmidt S, Manolescu A et al., 2005. Characterization of human SLC2A11 (GLUT-11) gene: alternative promoter usage, function, expression. and subcellular distribution of three isoforms and lack of mouse orthologue. *Mol Membr Biol* 22: 339-51.
- Schmidt S, Joost HG, Schurmann A 2009. GLUT-8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E614-8.
- Schmierer B, Hill CS 2007. TGF- β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Biol* 8: 970-81.
- Schroeder RE, Doria-Medina CL, Das UG et al., 1997. Effect of maternal diabetes upon fetal rat myocardial and skeletal muscle glucose transporters. *Pediatr Res* 41: 11-9.
- Schurmann A 2008. Insight into the “odd” hexose transporters GLUT-3, GLUT-5 and GLUT-7. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E 225-6.
- Schurmann A, Doege H, Ohnimus H et al., 1997. Role of conserved arginine and glutamate residues on the cytosolic surface of glucose transporter function. *Biochemistry* 36: 12897-902.

Scott AM, Antal CE, Newton AC 2013. Electrostatic and hydrophobic interactions differentially tune membrane binding kinetics of the C-2 domain of protein kinase alpha. *J Biol Chem* 288: 16905-15.

Shen X, Zhou N, Mi L et al., 2017. Phloretin exerts hypoglycemic effect in streptozotocin induced diabetic rats and improves insulin resistance in vitro. *Drug Design Develop Ther* 11: 313-24.

Shepherd PR, Kahn BB 1999. Glucose transporters and insulin action- implication for insulin resistance and diabetes mellitus. *New Engl J Med* 341: 248-57.

Shepherd PR, Gibbs EM, Wesslau C et al., 1992. Human small intestine facilitative fructose/ glucose transporters (GLUT-5) is also present in insulin responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes* 41: 1360-5.

Shi Y, Massague J 2003. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.

Shulman GI 2000. Cellular mechanism of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-6.

Shu G, Lu NS, Zhu XT et al., 2014. Phloretin promotes adipocytes differentiation in vitro and improves glucose homeostasis in vivo. *J Nutr Biochem* 25: 1296-308.

Simpson IA, Dwyer D, Malide D et al., 2008. The facilitative glucose transporter GLUT-3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E242-53.

Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S et al., 1991. Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* 113: 123-35.

Sogin DC, Hinkle PC 1980. Immunological identification of the human erythrocyte glucose transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5725-9.

Steen O, Goldenberg RM 2017. The role of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Canadian J Diabetes* 41: 517-23.

Stuart CA, Howell ME, Zhang Y, Yin D 2009. Insulin stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT-4 in normal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 3535-42.

Syu YW, Jiang CL, Tsai HY et al., 2018. GLUT-10 maintains integrity of major arteries through regulation of redox homeostasis and mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 27: 307-21.

Szablewski L 2017. Glucose transporters in health and cardiac disease. *Intern J Cardiology* 230: 70-5.

Tazawa S, Yamato T, Fujikura H et al., 2005. SLC5A9/ SGLT-4 a new Na⁺ dependent glucose transporter in an essential transporter for mannose, 1,5 anhydro glucitol and fructose. *Life Sci* 76: 1039-50.

Taylor PM 2014. Role of amino acid transporter in amino acid sensing. *Am J Clin Nutr* 99: 223S-30S.

- Thorens B, Mueckler M 2010. Glucose transporters in the 21st century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E 141-5.
- Turk E, Wright Em 1997. Membrane topology motifs in the SGLT cotransport family. *J Membr Biol* 159: 1-20.
- Uemura E, Greenlee NW 2001. Amyloid β peptide inhibits neuronal glucose uptake by preventing exocytosis. *Exp Neurol* 170: 270-6.
- Uemura E, Greenlee NW 2006. Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT-3. *Exp Neurol* 198: 48-53.
- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD et al., 2001. Identification of mammalian H^+ myo Inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J* 20: 4467-77.
- Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B 2002. GLUT-2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524: 199-203.
- Uldry M, Thorens B 2004. The SLC 2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 447: 480-9.
- Vallon V, Platt KA, Cunard R et al., 2011. SGLT-2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 22: 104-12.
- Vitart V, Rudan I, Hayward C et al., 2008. SLC2A9 is a newly identified urate concentration urate excretion and gout. *Nat Genet* 40: 437-42.
- Vrhovac I, Balen-Error D, Klessen D et al., 2015. Localization of the Na^+ -D-glucose cotransporters SGLT-1 and SGLT-2 in human kidney and of SGLT-1 in human small intestine, liver, lung and heart. *Pflugers Arch* 467: 1881-98.
- Vu TT, Marquez J, Le LT et al., 2018. The role of decorin in cardiovascular disease more than just a decoration. *Free Rad Res* 52: 1210-9.
- Walmsley AR, Lowe AG, Henderson PJF 1994. The kinetic and thermodynamics of the binding of cytochalasin B to sugar transporter. *Eur J Biochem* 221: 513-22.
- Wessels MW, Catsman-Berrevoets CE, Mancini GMS et al., 2004. Three new families with arterial tortuosity syndrome. *Am J Med Genet A* 131: 134-43.
- White MA, Tsouko E, Lin C et al., 2018. GLUT-12 promotes prostate cancer cell growth and is regulated by androgens and CaMKK2 signaling. *Endocr Relat Cancer* 25: 453-69.
- Widmer M, Uldry M, Thorens B 2005. GLUT-8 subcellular localization and absence of translocation to the plasma membrane in PC12 cells and hippocampal neurons. *Endocrinol* 146: 4727-36.
- Wight TN, 2018. A role for proteoglycans in vascular disease. *Matrix Biol* 71: 396-420.
- Wood IS, Trayhurn P 2003. Glucose transporters (GLUT-SGLT): expanded families of sugar transport protein. *Br J Nutr* 89: 3-9.

- Wright EM 2001. Renal Na⁺ glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F10-8.
- Wright EM, Turk E 2004. Sodium/glucose cotransporters Family SLC5. *Pflugers Arch* 447:510-8.
- Wright EM, Ghezzi C, Loo DDF 2017. Novel and unexpected function of SGLTs. *Physiology (Bethesda)* 32: 435-43.
- Wright EM, Hirayama Ba, Loo DDF, 2007. Active sugar transport in health and disease. *J Int Med* 261: 32-43.
- Wright EM, Hirsch JR, Loo DDF, Zampighi GA 1997. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J Exp Biol* 200: 287-93.
- Wright EM, Loo DD, Hirayama BA 2004. Surprising versatility of Na⁺ glucose cotransporters SLC5. *Physiology* 19: 370-6.
- Wright EM, Loo DD, Hirayama BA 2011. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev* 91: 733-94.
- Wu X, LI W, Sharma V et al., 2002. Cloning and characterization of glucose transporter 11 a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Mol Genet Metab* 76: 37-45.
- Wu X, Freeze HH 2002. GLUT-14 a duplicon of GLUT-3 is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80: 553-7.
- Yamanouche T, Tachibana Y, Akanuma et al., 1992. Origin and disposal of 1,5 anhydro glucitol a major polyol in human body. *Am J Physiol* 263: (Pt 1): E 268-78.
- Yamanouche T, Akanuma Y 1994. 1,5 anhydro glucitol (1,5 AG): a new clinical marker for glycemic control. *Diabetes Res Clin Pract* 24 (suppl): S 261-8
- You G, Lee WS, Barros EJ et al., 1995. Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J Biol Chem* 270: 29365-71.
- Xu Y, Rubin BR, Orme CM et al., 2011. Dual mode of insulin action controls GLUT-4 vesicle exocytosis. *J Cell Biol* 193: 643-53.
- Zeigerer A, Lampson MA, Karylowski O et al., 2002. GLUT-4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin regulated transport steps. *Mol Biol Cell* 13: 2421-35.
- Zhao FQ, Keating AF 2007. Functional properties and genomic of glucose transporters. *Curr Genomics* 8: 113-28.
- Zorzano A, Munoz P, Camps M et al., 1996. Insulin induces redistribution of GLUT-4 glucose carrier in the muscle fiber. In Search of GLUT-4 trafficking pathways. *Diabetes* 45: 570-81.

CAPÍTULO 9: SECREÇÃO DE INSULINA

Pâncreas: Um Órgão exócrino e endócrino

O pâncreas é um órgão fundamental para a regulação do metabolismo corporal, percebendo e respondendo a vários nutrientes circulantes. É um órgão que apresenta uma forma lobular (cabeça) e outra alongada (onde fica a cauda), localizado na parte superior do abdome, com a cabeça adjacente ao duodeno e a cauda se estendendo em direção ao baço. O pâncreas é uma glândula composta por duas regiões, uma região exócrina e outra endócrina. A maior parte do tecido pancreático está voltado para a função exócrina, secretando enzimas digestivas diretamente no duodeno, através de ductos. As células, que produzem enzimas digestivas são células acinares, perfazendo cerca de 85% do pâncreas [Atkinson, Campbell-Thompson et al., 2020]. As células acinares são arranjadas em ácinos e ductos (muito semelhante a glândula salivar parótida), secretam enzimas que atuam na digestão de lipídeos (lipases), carboidratos (amilase) e proteínas (tripsina) [Husain, Thrower 2009; Jouvét, Stall 2017]. Quando o alimento entra no duodeno, o pâncreas é estimulado a produzir e secretar água, bicarbonato, enzimas (amilase e lipases) e zimogênios (tripsinogênio, quimotripsinogênio, procarboxipeptidase). Zimogênios são proteínas cataliticamente inativas, que se tornam enzimas ativas por clivagem proteolítica limitada. São também conhecidas como pró-enzimas. A região endócrina é constituída por células agrupadas formando as ilhotas de Langerhans. No pâncreas existem cerca de 1 milhão desses micro-órgãos [In't Veld, Marichal 2020]. Quando as ilhotas são pequenas, elas são formadas primariamente por células β , enquanto ilhotas grandes tem um número igual de células β e α [Kilimnik, Jo et al., 2012]. As ilhotas são derivadas da endoderme, são de forma ovalada e altamente vascularizadas e inervadas pelo sistema simpático e parassimpático [Ahrén 2000; Jain, Lammert 2009].

Diferenças significativas na estrutura e relação funcional entre as ilhotas de roedores e de humanos são descritos na literatura, o que apresenta um desafio aos pesquisadores. Em roedores cada ilhota é constituída por 70-80% de células beta, 5% de células delta e 15-20% de células alfa, épsilon e gama. Já em ilhotas de humanos a proporção de células beta e não beta é diferente dos roedores. As células betas são compostas por cerca de 55% da massa de células das ilhotas e as células alfas cerca de 35% [Cabrera, Berman et al., 2006; Brissova, Fowler et al., 2005]. Enquanto as ilhotas de roedores são altamente vascularizadas, as ilhotas de humanos apresentam menor densidade vascular [Walker, Saunders et al., 2021]. Numa análise morfológica sobre o arranjo das células alfa e beta nas ilhotas de Langerhans humanas, foi verificado, que todas as células endócrinas se localizam adjacente aos vasos sanguíneos, favorecendo o contato heterólogo entre células alfa e beta e o contato homólogo entre as células beta. Também, foi observado, que as células das ilhotas estão organizadas numa placa trilaminar compreendendo uma camada de células beta imprensada entre duas camadas de células alfa [Bosco, Armanet et al., 2010]. As ilhotas de Langerhans são organizadas por cinco tipos diferentes de células, a saber, células alfa, beta, épsilon, delta e gama (PP). As células α secretam o glucagon, as células β secretam a amilina, o polipeptídeo C e a insulina, as células ϵ secretam a grelina, as células δ secretam a somatostatina e as células γ (PP) secretam o polipeptídeo pancreático. A secreção endócrina é responsável pela manutenção da homeostase da glicose, através de suas ações nos tecidos como fígado, músculo e tecido adiposo. A função secretora pancreática é regulada por mecanismos neurócrinos, endócrinos e parácrinos. O glucagon e a insulina apresentam ações contrárias, enquanto a insulina, após se ligar ao receptor cognitivo no músculo e tecido adiposo, estimula a captação de glicose pelos tecidos diminuindo os níveis sanguíneos de glicose, o glucagon, por sua vez mobiliza a glicose hepática para a circulação aumentando os níveis sanguíneos do monossacarídeo [Goke 2008]. Portanto, a insulina é um hormônio anabólico, promovendo a glicogênese, a lipogênese e a incorporação de amino ácidos em proteínas, enquanto o glucagon é um hormônio catabólico. A

somatostatina é um hormônio que inibe a secreção das células alfa e das células beta [Kanno, Gopel et al., 2002; Hauge-Evans, King et al., 2009], por regulação parácrina. Hormônio parácrinos são aqueles hormônios que viajam uma curta distância e interagem com receptores cognatos de células vizinhas.

MECANISMO DO PROCESSO SECRETOR

A insulina é o único hormônio cuja função é a de reduzir a concentração de glicose plasmática, de modo que a homeostase da glicose se relaciona diretamente a regulação do processo secretor da insulina. A função das células beta pancreáticas é a de secretar insulina na hora certa e na quantidade apropriada. Qualquer mudança no funcionamento das células beta influencia a homeostase da glicose, levando a um estado hipoglicêmico, quando a quantidade secretada for excessiva, ou ao estado hiperglicêmico quando a secreção for insuficiente. Portanto, as células betas estão sob um estreito controle de fatores estimuladores e inibidores dos quais a glicose ocupa o principal lugar [Grotsky, Batts et al., 1963; Coore, Randle 1964; Henquin JC 2009]. Secretada unicamente pelas células beta pancreáticas, a insulina não regula somente a concentração plasmática de glicose, mas também, modula o metabolismo da glicose em vários tecidos. A insulina é um hormônio de natureza proteica, sintetizada sob a forma de préproinsulina. A préproinsulina, recém-sintetizada é composta em sua extremidade N-terminal de um segmento de 24 resíduos de amino ácidos denominado peptídeo sinal, além de um segmento correspondente a cadeia B da insulina, um segmento correspondente a cadeia A da insulina e um segmento representado pelo peptídeo C. A função do peptídeo sinal é a de guiar o deslocamento da préproinsulina até o retículo endoplasmático [Dodson, Steiner 1998; Liu, Wright et al., 2014]. No retículo endoplasmático, a préproinsulina sofre uma clivagem pela peptidase sinal com a retirada do peptídeo sinal, transformando-se na proinsulina [Sun, Cui et al., 2015]. A proinsulina sofre um dobramento e formação de 3 ligações dissulfetos, duas entre as cadeias polipeptídicas e outra na mesma cadeia. A proinsulina forma dímeros associados não covalentemente, que são transportados do retículo endoplasmático até o complexo de Golgi e em grânulos secretores durante o qual a proinsulina forma hexâmeros e processada por proteólise. A proinsulina, por meio de uma clivagem proteolítica é transformada na insulina biologicamente ativa. A clivagem proteolítica ocorre nas ilhotas por proteases, que atuam entre os resíduos 30-31 e 65-66. Este procedimento libera 2 moléculas, um fragmento de 35 resíduos de amino ácidos, o peptídeo C e a insulina, que é formada de uma cadeia polipeptídica de 21 resíduos de amino ácidos chamada cadeia A e uma cadeia polipeptídica de 30 resíduos de amino ácidos, chamada cadeia B. As cadeias A e B são ligadas por pontes dissulfetos. Tanto a insulina quanto o peptídeo C são armazenados nas vesículas secretoras e são liberados juntos em concentrações equimoleculares, em resposta ao aumento do nível de glicose [Vakilian, Tahamtani, Ghaedi 2019]. O processo molecular da secreção de insulina pelo pâncreas baseia-se no acoplamento estímulo-secreção, também chamado exocitose dependente de determinado estímulo, como é o caso da secreção de insulina estimulada pela glicose [Ashcroft, Procks et al., 1994]. Vários nutrientes podem atuar como secretagogos de insulina, incluindo a glicose, ácidos graxos, amino ácidos, incretinas, gradiente eletroquímico de $\text{Ca}^{2+} / \text{K}^{+}$, fatores metabólicos de acoplamento [Keane, Newshome 2014; MacDonald, Fahien et al., 2005]. Os modelos de acoplamento estímulo-secreção, tornam as células beta um sensor de combustível eletricamente excitável sob controle hormonal e neural. Esses modelos dão ênfase para o papel chave dos canais de K^{+} sensível ao ATP (K ATP) para a transdução ou alterações no metabolismo da glicose, alterações no potencial de membrana, influxo de Ca^{2+} e concentração de Ca^{2+} livre citossólico $[\text{Ca}^{2+}]_c$ [Henquin 2009]. Contudo, o estímulo fisiológico primário para a secreção de insulina é o aumento da concentração de glicose circulante, que ocorre no estado pós-prandial. Esta estimulação da secreção de insulina pela glicose envolve duas fases, a fase

desencadeante e a amplificativa [Henquin 2009]. Os termos, canal dependente de KATP e vias independentes de KATP são comumente conhecidos como vias desencadeantes e amplificativa [Henquin 2009].

A glicose que é transportada pelo GLUT para dentro das células beta pancreáticas é imediatamente fosforilada para glicose-6-fosfato, que então segue a via glicolítica fornecendo, como produto final o piruvato. Este piruvato entra na mitocôndria ativando o ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos, com formação de equivalentes redutores NADH e FADH₂. Os equivalentes redutores são oxidados na cadeia de transporte de elétrons ou cadeia respiratória, formando ATPs e reduzindo a quantidade de ADPs. Em condições basais, isto é, na presença de concentrações não estimuladoras de glicose, a taxa do metabolismo das células beta é relativamente baixa e suficiente para que o canal K ATP permaneça aberto na membrana plasmática, contrabalanceando as correntes despolarizantes e mantendo o potencial de membrana em valores mais negativos do que o limiar para a abertura do canal de Ca²⁺ dependente de voltagem. O influxo de Ca²⁺ é o mínimo, a concentração intracelular de Ca²⁺ [Ca²⁺]_c é baixa e a secreção de insulina é basal. Quando a concentração de glicose aumenta, o metabolismo das células beta acelera, aumentando a formação de ATP mitocondrial e reduzindo o ADP, o que induz o fechamento do canal de K⁺ sensível ao ATP [Tarasov, Dusonchet, Ashcroft 2004; Detimary, Van der Berghe, Henquin 1996; Henquin JC 2009], ativando o canal de Ca²⁺ dependente de voltagem. Este canal iônico dependente de voltagem, constitui uma classe de proteínas transmembranas, que forma canais de íons, ativados por alterações no potencial elétrico da membrana próximo ao canal. O potencial de membrana altera a conformação da proteína do canal regulando sua abertura e fechamento [Rorsman, Ashcroft 2018]. O aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ resultante durante a fase desencadeante, ativa a exocitose dos grânulos secretores de insulina do pool de grânulos prontamente liberados, facilitado por um complexo proteico durante a fusão da membrana, formando poros através dos quais a insulina é liberada para o exterior da célula [Gaisano 2017]. A fase desencadeante responde por um pico de secreção e um declínio, que ocorre nos primeiros 10-20 minutos após o estímulo com glicose [Campbell, Newgard 2021]. A fase amplificativa, envolve um conjunto de estímulos secundários, que permite a continuidade da secreção de insulina numa taxa baixa, mas sustentada durante a fase absorviva de alimentos. A fase amplificativa, também denominada de segunda fase ou fase independente do canal KATP é ativa mesmo na presença de níveis máximos de Ca²⁺ intracelular [Campbell, Newgard 2021]. A fusão de membranas é um processo importante nos organismos. Os conteúdos, das vesículas de secreção são liberados via poros de fusão. Os poros de fusão começam com um diâmetro estreito que dilata lentamente, podendo flutuar em tamanho ou pode fechar completamente [Toledo, Montes et al., 2018].

A formação, dilatação e fechamento eventual do poro de fusão é controlado por um conjunto de proteínas. A fusão das vesículas secretoras de insulina, com as membranas plasmáticas são intermediados por proteínas associadas ao receptor proteico, associado a sinaptossomos SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptors*). Snare é uma família de proteínas de membranas, que estão envolvidas no processo secretor. Dois tipos principais de proteínas SNARE são localizados nas superfícies de vesículas (v-SNARE) e na membrana plasmática (t-SNARE), que intermediam a fusão de vesículas através da formação do complexo SNARE [Drews, Krippeit-Drews, Duffer 2010]. Na membrana plasmática existem dois tipos principais de t-SNARE referidos como syntaxina e proteína associada ao nervo sinaptossomal 25, SNAP-25 (*Synaptosomal-Nerve-Associated-Protein*) [Drews, Krippeit-Drews, Duffer 2010; Rizo, Xu 2015]. A syntaxina tem um domínio transmembrana na porção C-terminal, um domínio de SNARE chamado Qa ou motivo H3-SNARE e um domínio regulador no N-terminal chamado Habc. Por outro lado, o SNAP-25 é uma proteína ancorada em lipídeo, que possui dois domínios SNARE denominados Qb e motivo Qc-SNARE no N-terminal e C-terminal [Rizo, Rosemund

2008; Rizo, Xu 2015]. A palmitoilação de SNAP-25 fornece a plasticidade para o núcleo do complexo SNARE, permitindo a sua dissociação durante a fusão.

Outra proteína envolvida no processo secretor é a sinaptogamina ou sinaptotagmina que liga o cálcio [Fu, Gilbert, Liu 2013]. A fusão é um processo que pode ser dividido em etapas [Vakilian, Tahmtani, Ghaed 2019] (1) O complexo SNARE funde as bicamadas lipídicas das duas membranas, isto é, a das vesículas e a da membrana plasmática; (2) A região fundida permanece se expandindo através de uma super-hélice (coiled-coils) e (3) finalmente, o poro de fusão é formado com um diâmetro pequeno, o qual sofre uma dilatação liberando o conteúdo da vesícula secretora.

A proteína SNARE transmembrana está envolvida na formação do poro de fusão e secreção [Wu, Thiyagarajan et al., 2017]. A fusão requer a formação do complexo de SNARE trans, de v-SNARE e t-SNARE, da vesícula e membrana plasmática respectivamente [Sudhof, Rothman 2009]. O complexo de SNARE trans formado, de alta energia, é fechado (como um zíper) em complexo SNARE cis, de baixa energia, promovendo consequentemente a formação do poro de fusão [Vardjan, Jorgacevski, Zorec 2017]. Inicialmente o poro é pequeno, com poucos nanômetros (nm) de diâmetro, pode flutuar em tamanho e pode “piscar” repetidamente entre aberto e fechado antes da liberação ou dilatação irreversível. Várias características do domínio transmembrana de SNARE podem influenciar a abertura e a dinâmica do poro: (1) flexibilidade do domínio transmembrana; (2) interações específicas entre os domínios transmembrana e (3) interações entre o domínio transmembrana e lipídeos [Wu, Thiyagarajan et al., 2017].

FATORES QUE INFLUENCIAM A SECREÇÃO

1.-Adenosina Monofosfato cíclico (cAMP)

O cAMP é um amplificador importante do processo secretor de insulina pelas células das ilhotas de Langerhans, estimuladas pela glicose. A concentração do cAMP nas células beta pancreáticas depende do equilíbrio entre sua síntese pela adenilato ciclase e sua degradação pela fosfodiesterase. A formação de cAMP resulta do receptor acoplado a proteína G (GPCR) levando a ativação das proteínas Gs e dissociação do complexo $G\alpha\beta\gamma$ com a ativação da adenilato ciclase [Selbie, Hill 1998]. O receptor acoplado a proteína G consiste de complexos heterotriméricos de subunidades α , β , γ . A subunidade α é uma proteína hidrofílica contendo um sítio de ligação para o nucleotídeo guanínico. A subunidade α_s (subunidade α estimuladora) da família Gs estimula a adenilato ciclase que vai formar o cAMP. Ao contrário, as subunidades α_i (subunidade α inibidora) da família Gi inibe a adenilato ciclase. A GPCR é uma proteína formada por 7 domínios (α hélices) transmembranas com o N-terminal extracelular e o C-terminal citoplasmático. A adenilato ciclase constitui uma família de enzimas com 10 membros muitos deles expressos nas células das ilhotas pancreáticas [Delmeire, Flamez et al., 2003; Tengholm, Gylfe 2017]. A maior parte delas são reguladas por receptores acoplados a proteína G, que intermedia ou a estimulação (Gas) ou a inibição (Gai). Algumas são, também, ativadas por Ca^{2+} /CaM (cálcio/calmodulina) e fosforilação por proteínas quinases. A concentração de cAMP, também é regulada em nível degradativo pela fosfodiesterase nucleotídeo cíclico (PDE), que catalisa a hidrólise do cAMP para 5'-AMP. As fosfodiesterases nucleotídicas cíclicas (PDE) compreendem cerca de 100 isoformas derivadas de 11 famílias de genes conhecidas. As enzimas mostram diferenças em suas distribuições teciduais seletividade ao substrato, cinética, regulação e susceptibilidade a inibição farmacológica [Furman, Ong, Pyne 2010]. Várias isoformas de PDE incluindo PDE-1, PDE-3B, PDE-4 e PDE-8B contribuem para a atividade total de PDE nas células beta [Pyne,

Furman 2003; Furman, Pyne et al., 2004].

Os receptores acoplados a proteína G são moduladores primários no acoplamento estímulo-secreção de insulina que inicia, potencializa e inibe a secreção de insulina estimulada pela glicose. O metabolismo da glicose está acoplado a cAMP. A glicose dentro da célula é metabolizada passando pela via glicolítica onde há a formação de poucos ATPs, ciclo de Krebs onde são formados os equivalentes redutores, que vão alimentar a cadeia de transporte de elétrons, onde são formados a maior quantidade de ATP. O ATP então pode ser convertido a cAMP numa reação catalisada pela adenilato ciclase [Sadana, Dessauer 2009], que por sua vez ativa a proteína quinase A (PKA) [Das, Sposito et al., 2007] e a proteína de troca diretamente ativada pelo cAMP (Epac-2) [Li, Tsalkova et al., 2011; Leech, Chepurny et al., 2010]. O Epac-2 pode influenciar a secreção de grânulos de insulina através de dois mecanismos: interação com SUR-1 e interação direta com canais de cálcio. SUR-1 é uma subunidade do canal de potássio (K ATP) localizada na membrana plasmática e nas membranas dos grânulos secretores das células beta [Kang, Chepurny et al., 2006]. Epac-2 é uma proteína de p.m. 116 KDa que contém dois domínios, o regulador e o catalítico [Sugawa, Shibasaki et al. 2016]. SUR-1 recruta Epac-2 levando a ativação de Rap-GTPase, que estimula a fosfolipase C [Schmidt, Evelin et al., 2001, aumentado os níveis de IP3 que estimula a atividade dos canais de KATP, reduzindo a sensibilidade do canal ao ATP [Baukrowitz, Schulte et al., 1998]. Rap é uma proteína da família Ras.

2.- Incretinas

Hormônios incretinas são peptídeos secretados por células intestinais em resposta a ingestão de nutrientes, que desempenham um papel importante, tanto na regulação da função das ilhotas pancreáticas, quanto nos níveis de glicose plasmática. Essas células enteroendócrinas localizadas na parede intestinal são polarizadas com projeções semelhantes a dedos. Essas projeções expressam receptores químicos sensíveis a várias classes de nutrientes. A outra extremidade das células enteroendócrinas localiza-se próximo a capilares e terminações nervosas e contém vesículas secretoras que respondem aos receptores químicos do lúmen [Gutierrez-Aguillar, Woods 2011]. Duas incretinas principais foram descritas para os humanos: (1) o peptídeo semelhante ao glucagon-1, GLP-1 (Glucagon Like Peptide) e (2) o polipeptídeo insulínico dependente de glicose, GIP. O GIP foi isolado pela primeira vez na década de 1960 recebendo o nome de peptídeo inibidor gástrico, daí a sigla GIP (*Gastric Inhibitory Polypeptide*) [Creutzfeldt 1979]. Essas incretinas GIP e GLP-1 são secretadas respectivamente pelas células K e L, componentes do sistema enteroendócrino difuso, que inclui uma variedade de tipos celulares espalhados ao longo do epitélio intestinal. O efeito incretínico é definido como um fenômeno através do qual a glicose ingerida por via oral, provoca uma resposta de secreção de insulina muito maior do que a administrada por infusão intravenosa de glicose, numa taxa que estimula os níveis de glicose sanguínea pós-prandial [Deacon, Ahrén 2011]. De acordo com Creutzfeldt, os critérios fundamentais necessários para um hormônio ser classificado como incretina são: (1) uma incretina tem que ser um fator gastrointestinal; (2) uma incretina deve ser liberada, estimulada pelos nutrientes e (3) uma incretina deve estimular a secreção de insulina a níveis fisiológicos de forma dependente de glicose [Creutzfeldt 1979].

Dados de experimentos in vivo e in vitro sugerem que a rápida elevação de GIP e GLP-1 plasmática, após a ingestão oral de glicose está diretamente ligada a captação eletrogênica de glicose pelas células K e L, resultando na despolarização da membrana plasmática, entrada de cálcio pelo canal de cálcio dependente de voltagem e intensificação de exocitose vesicular [Psichas, Reimann, Gribble 2015; Reimann, Gribble 2016].

O mecanismo de ação de incretinas na secreção de insulina inclui a ligação de GIP e GLP-1 a seus respectivos receptores, ambos expressos nas células pancreáticas [Moen, Heimberg et al., 1996]. A ligação de GIP e GLP-1 a seus respectivos receptores, induz uma alteração conformacional na estrutura do receptor, seguido por uma troca de GDP por GTP e a subsequente dissociação da subunidade Gas dos receptores. Essa subunidade estimuladora ativa a adenilato ciclase, que por sua vez converte ATP em cAMP, estimulando as vias já descritas anteriormente [Drucker, Philippe et al., 1987; Ramos, Zippin et al., 2008; Holz, Leech, Habener 1995; Order, Wu et al., 2016]. Uma vez secretado pelas células K, o GIP liga o seu receptor específico induzindo os seus efeitos fisiológicos. A expressão gênica do receptor GIPR, está presente em vários tecidos como o pâncreas, estômago, intestino delgado, tecido adiposo, córtex adrenal, baço, rins e outros [Baggio, Drucker 2007; Kim, Egan 2008]. Com a glicose plasmática basal, 5 mM (90 mg/dL) a infusão de GIP não induz a secreção de insulina contudo a medida que a concentração de glicose aumenta a secreção de insulina estimulada pela glicose aumenta, numa forma, que é dependente da concentração de glicose [Elahi, Andersen et al., 1979]. O polipeptídeo insulínico dependente de glicose ou peptídeo inibidor gástrico (GIP) é um peptídeo composto por 42 amino ácidos, que potencializa a secreção de insulina estimulada pela glicose, sendo essa função considerada a mais importante do hormônio [Dupre, Ross et al., 1973; Jornvall, Carlquist et al., 1981].

O GLP-1 é um peptídeo de 30 aminoácidos, secretado pelas células L. Seus efeitos ocorrem após sua ligação com o seu receptor específico. A GLP-1 existe sob duas formas bioativas, GLP-1 (7-37) com extensão de glicina e GLP-1 (7-36) amidado [Holst 2007; Sandoval, D'Alessio 2015]. Da mesma forma que a GIP, a secreção de GLP-1 induzida pela glicose, envolve o cotransportador SGLT-1 [Moriya, Shirakura et al., 2009]. Da mesma forma que GIP, o efeito de GLP-1 é exercido via receptor GLP-1R estimulando a secreção de insulina dependente de glicose num nível acima de 4,3 mM (77 mg/dL) [Nauck, Heimesaat et al., 2002]. Ao contrário de GIP, o GLP-1 é um forte inibidor da secreção de glucagon, um fenômeno dependente da concentração de glicose acima de 3,7 mM (66 mg/dL) [Nauck, Heimesaat et al., 2002]. Ambos, GIP and GLP-1 promovem a exocitose de insulina dependente e independente da proteína quinase A (PKA), independente de alterações na entrada de cálcio [Renstrom, Eliasson, Rorsman 1997; Gromada, Bokvist et al., 1998; Ding, Gromada 1997].

3. Ácidos Graxos Livres

Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos com cadeias de carbono alifáticas curtas quando o número de átomos de carbono é menor do que seis; cadeias médias, quando o número de átomos de carbono varia entre 8 e 14 cadeias longas, quando o número de átomos de carbono for maior do que 14. Cadeia alifática refere-se a compostos orgânicos em que os átomos de carbono são ligados entre si por ligações simples, duplas ou triplas, formando estruturas não aromáticas. Portanto, compostos orgânicos podem ser de estruturas abertas ou fechadas. Os ácidos graxos que apresentam ligações simples entre seus átomos de carbono são chamados ácidos graxos saturados. Ao contrário quando houver ligações duplas entre eles, os ácidos graxos são conhecidos como insaturados. Os ácidos graxos são ácidos fracos apresentando um pK de cerca 4,8. O pK de uma substância é o pH do meio onde a substância está 50% na forma ionizada e 50% na forma não ionizada. Em condições normais o pH do plasma sanguíneo é de 7,4 enquanto o pH intracelular é 7,0. Portanto, tendo-se em vista que o pH dos fluidos corporais é muito maior do que o pK de ácidos graxos, podemos considerar que 99% dos ácidos graxos estão ionizados nos fluidos corporais (Tabela 9.1).

Tabela 9.1 - Alguns ácidos Graxos Biológicos

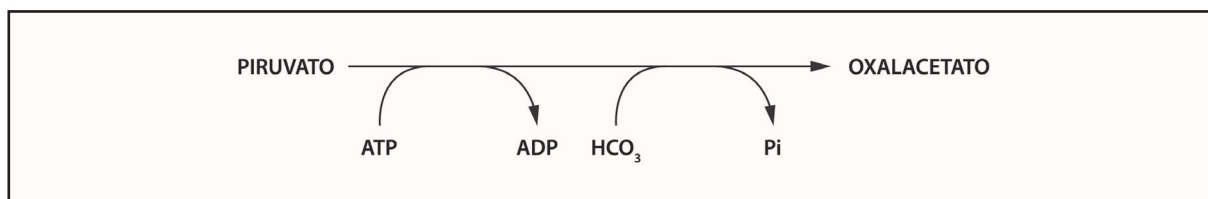
Ácidos graxos biológicos		
Tipo	Ácido	Fórmula
Saturados	Láurico	CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -C, OOH
	Mirístico	CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ -COOH
	Palmírico	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -COOH
	Estearíco	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -COOH
Insaturados	Oleico	CH ₃ -(CH ₂) ₅ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH
	Palmitoleico	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH
	Linoleico	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂) ₂ -(CH ₂) ₆ -COOH

Já está bem estabelecido que a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, está diretamente ligada ao metabolismo da glicose. Como já vimos a glicose entra na célula beta pancreáticas através de transportadores GLUT e uma vez dentro das células são imediatamente fosforiladas, tanto pela hexoquinase, que tem alta afinidade pela glicose (Km baixo) ou também pela glicoquinase ou hexoquinase IV que apresenta baixa afinidade (Km alto), formando a glicose-6-fosfato. Este metabolito pode seguir a via glicolítica, onde são formados poucos ATPs com a produção de piruvato. O piruvato vai a mitocôndria onde é ativado pela coenzima A, formando a acetil-CoA, que condensa com o oxalato formando o citrato já no ciclo de Krebs. Este ciclo, também chamado ciclo dos ácidos tricarboxílicos forma os equivalentes redutores (NADH e FADH₂), os quais na cadeia de transporte de elétrons formam grande quantidade de ATP. O aumento da concentração de ATP e a consequente redução da concentração de ADP, aumenta a carga energética dada pela relação ATP/ADP causando o fechamento do canal de K⁺ sensível ao ATP (K_{ATP}), despolarização da membrana plasmática seguido da abertura do canal de Ca²⁺ dependente de voltagem. Com isso a entrada de cálcio para o interior da célula, aumenta sua concentração intracelular [Ca²⁺]_i desencadeando a exocitose dos grânulos de insulina [Aschcroft, Rorsman 1990; Prentki 1996].

Diante do acima exposto, podemos dizer, que as células betas pancreáticas são dotadas de um sistema de acoplamento estímulo-resposta único, que requer o estímulo pelo combustível (glicose) para iniciar os eventos elétricos da membrana celular, responsável pela despolarização da membrana e secreção [Hedskov CJ 1980; Aschcroft, Harrison, Aschcroft 1984; Yaney, Corkey 2003]. Várias vias de amplificação podem modular a secreção de insulina canalizando o piruvato através da piruvato carboxilase nas vias, anaplerose/cataplerose. Com isso, os níveis citossólicos de oxalacetato e citrato aumentam, gerando moléculas de sinalização derivados do metabolismo, importantes para a secreção de insulina [Cline, Lepine et al., 2004; McDonald, 1995; Benito-Vicente, Jebari-Benslaiman et al., 2021]. O que é anaplerose? O que é cataplerose? O termo anaplerose refere-se as reações químicas destinadas a suprir os intermediários do ciclo de Krebs que estão reduzidos. O ciclo de Krebs funciona não somente na formação de equivalentes redutores para alimentar o transporte de elétrons, mas também, em processos biossintéticos, em que intermediários são removidos do ciclo. Isto requer reações anapleróticas para reabastecer os intermediários do ciclo de Krebs que estão reduzidos, de modo a dar continuidade a sua

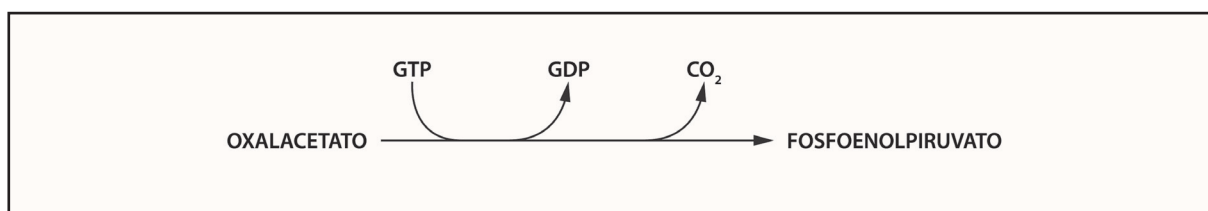
função. A piruvato carboxilase que sintetiza o oxalacetato na matriz mitocondrial é um exemplo de enzima anaplerótica. Sua atividade é alta em muitos tecidos (por exemplo 10-12 unidades/ g de fígado) sendo a acetil-CoA um ativador alostérico. Uma unidade de enzima é a quantidade de enzima, que converte 1 μmol de substrato a produto em 1 minuto (Figura 9.1). Reações anapleróticas são indispensáveis durante os processos de gliconeogênese e lipogênese, quando o malato (gliconeogênese) e o citrato (lipogênese) deixam a mitocôndria para formar glicose e ácidos graxos respectivamente [Owen, Kahlan, Hanson 2002].

Figura 9.1 - Reação catalisada pela piruvato carboxilase



Essa reação se processa através de duas etapas: na primeira o ATP reage com o bicarbonato formando a carboxifosfato e posteriormente com a intervenção do cofator biotina há a fixação do CO_2 no piruvato formando o oxalato. Por outro lado, a cataplerose refere-se as reações químicas responsáveis pela remoção de intermediários do ciclo de Krebs, para evitar o acúmulo do ânion na matriz mitocondrial. A fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) é um exemplo de enzima cataplerótica. Na cataplerose, a PEPCK é de especial importância, porque é uma rota comum de geração de PEP. A reação envolve a guanosina trifosfato (GTP) como agente fosforilante [Owen, Hanson 2002] (Figura 9.2). A carboxilação da acetil-CoA, pela enzima acetil-coenzima A carboxilase produz o malonil-CoA, um processo importante que pode mudar o processo de oxidação de ácidos graxos para o processo de formação de lipídeos complexos.

Figura 9.2 - Reação catalisada pela PEPCK



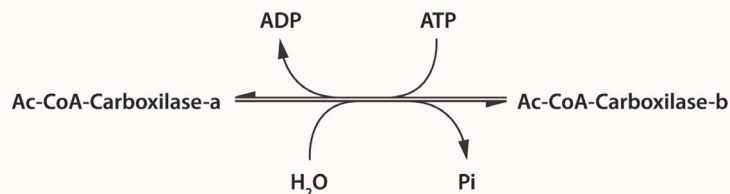
Combustíveis que aumentam o nível de malonil-CoA estimulam a secreção de insulina [Prentki, Vischer et al., 1992]. Por outro lado, a inibição da produção de malonil-CoA inibe a secreção de insulina [Chen, Ogawa et al., 1994]. A liberação de insulina promovida pelo malonil-CoA depende do aumento de cálcio citossólico, causado pela via dependente do canal KATP e da disponibilidade predominante de ácidos graxos para as células [Nolan, Madiraju et al., 2006]. Os níveis de malonil-CoA são também influenciados pela atividade da adenosina monofosfato quinase (AMPK) [Ruderman, Prentki 2004]. A AMPK ativa a produção de energia celular, estimulando a oxidação de glicose e ácidos graxos e reduzindo o consumo de energia nos processos biossintéticos e esterificação de ácidos graxos [Ruderman, Prentki 2004; Khan, Alquier et al., 2005]. A malonil-CoA derivado do metabolismo por anaplerose/cataplerose é um inibidor alostérico da enzima carnitina-palmitoil transferase [McGarry, Brown 1997]. A enzima carnitina-palmitoil transferase, também chamada carnitina acil transferase é uma enzima mitocondrial responsável pela formação da acilcarnitina. Como a membrana mitocondrial interna é impermeável para ácidos graxos de cadeia longa, esses ácidos graxos são transportados para a mitocôndria na forma de acilcarnitina. A etapa de formação da acilcarnitina, catalisada pelas carnitina acil transferase é inibida pela malonil-CoA. Essa inibição causa aumento da

disponibilidade de ácidos graxos de cadeia longa acil-CoA para a sinalização lipídica em processos celulares envolvidos na exocitose. O termo, sinalização lipídica refere-se ao mecanismo pelo qual moléculas de lipídeos e também ácidos graxos livres enviam mensagens para efetores na célula que alteram o processo de exocitose [Nolan, Madiraju et al., 2006]. Quando ocorre a privação de combustível, no jejum ou durante exercício, há aumento da concentração de AMP pelo consumo de ATP e a relação AMP/ATP aumenta ativando a enzima AMP quinase. Esta enzima catalisa a fosforilação da acetil-CoA carboxilase, enzima que contém como grupo prostético a biotina. A acetil-CoA-carboxilase fosforilada é inativa, o que reduz a síntese de malonil-CoA. Vários trabalhos mostram a participação da sinalização malonil-CoA/ácidos graxos na regulação da secreção de insulina [Roduit, Nolan et al., 2004; Farfari, Schulz et al., 1999; Liang, Matschinski 1991; Nolan, Madiraju et al., 2006]. A carboxilação da acetil-CoA ocorre em etapas:



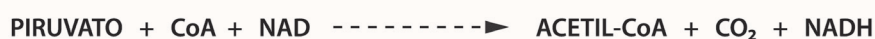
O bicarbonato é utilizado como fonte de CO_2 . Inicialmente, o CO_2 é ligado ao cofator biotina usando a energia derivada da hidrólise do ATP. O CO_2 é então transferido ao acetil-CoA. A acetil-CoA-carboxilase existe sob duas formas, uma inativa e outra ativa. A fosforilação da acetil-CoA carboxilase é realizada pela enzima AMP quinase e desfosforilada por proteína fosfatase. Ela é regulada pelos hormônios glucagon e epinefrina que são inibidores e pela insulina que é ativadora (Figura 9.3).

Figura 9.3 - Esquema da regulação da acetil-CoA carboxilase. Ac-CoA-carboxilase-a = inativa; Ac-CoA-carboxilase-b = ativa



Um aspecto que estava sendo estudado era se outros nutrientes que não a glicose, estariam envolvidos na regulação da função das células beta pancreáticas. Um nutriente, os ácidos graxos em especial, chamou a atenção pelos seguintes motivos: (1) os ácidos graxos constituem a maior parte de combustível consumido pelas células [Berne 1975; Malaisse, Malaisse-Lagae 1985]; (2) os ácidos graxos não esterificados estão aumentados em indivíduos diabéticos tipo 2, e (3) os ácidos graxos induzem a resistência a insulina [Grill, Qvigstad 2000].

A exposição de ilhotas de ratos a ácidos graxos durante 48 horas, mostrou uma redução da atividade da piruvato desidrogenase e ao mesmo tempo um aumento na atividade da piruvato desidrogenase quinase [Zhou, Grill 1995]. Vejamos o significado desses resultados: em condições aeróbicas, o piruvato proveniente da metabolização da glicose pela glicólise é transportado à mitocôndria, trocado por OH^- . Na matriz mitocondrial, o piruvato sofre descarboxilação oxidativa pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase. Complexos enzimáticos, em geral, são grupos de enzimas associadas não covalentemente que catalisam duas ou mais fases sequenciais na via metabólica. O complexo enzimático piruvato desidrogenase, consiste de três enzimas: piruvato desidrogenase; dihidrolipoil-transacetilase e dihidrolipoil desidrogenase e catalisa a seguinte reação:



A atividade do complexo piruvato desidrogenase é regulada alostericamente por substratos e produtos de reações enzimáticas. É também regulada por processo de fosforilação e desfosforilação. A fosforilação torna a enzima inativa, enquanto a desfosforilação a torna ativa. Como a atividade da piruvato desidrogenase aumentou podemos concluir que a redução da atividade de piruvato desidrogenase se deve ao processo de fosforilação. Com isso, a reduzida formação de acetil-CoA afeta o metabolismo aeróbico, mas não o metabolismo anaeróbico. Nesta situação, também a formação de malonil-CoA fica afetada e como já vimos o malonil-CoA inibe a enzima carnitina palmitoil transferase e conseqüentemente o catabolismo de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria, disponibilizando esses ácidos graxos para a produção de diacil glicerol e outros lipídeos, ésteres de CoA de cadeia longa podem fornecer substrato para a acilação de proteínas ou podem modular a atividade C quinase, resultando na liberação de insulina [Benito-Vicente, Jebari-Benslaïman et al., 2021]. Os efeitos de ácidos graxos específicos sobre a secreção da insulina e sobrevivência das células beta estão relacionados com o grau de saturação e comprimento da cadeia carbônica [Benito-Vicente, Jebari-Benslaïman et al., 2021].

4. Glicina

A glicina é o aminoácido mais simples (H_2-N-CH_2-COOH) presente em todas as proteínas. Por exemplo no colágeno, que contém 25-35% de glicina, este aminoácido desempenha um papel crucial na manutenção da estrutura helicoidal da proteína. Classificada como um aminoácido não essencial, pelo fato de ser sintetizada endogenamente [Wang, Wu et al., 2013], evidências mostram que a quantidade de glicina sintetizada in vivo é insuficiente para cobrir as demandas metabólicas [Wang, WU et al., 2013; Rezaei, Wang et al., 2010]. Outro aspecto observado é que o nível plasmático de glicina se encontra reduzido tanto na obesidade quanto no diabetes [Takashina, Tsujino et al., 2016; Wahren, Felig et al., 1972; Fiehn, Garvey et al., 2010]. A glicina apresenta vários papéis no controle da glicose plasmática, sendo por isso considerada com atividade antidiabética [Immenshahidi, Hossenzadeh 2022]. A glicina participa tanto no estresse oxidativo quanto na secreção de insulina. É sabido que o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes desempenha um papel significativo na patogênese de diabetes e da síndrome metabólica [Wang, Du et al., 2014]. Na diabetes a síntese do antioxidante glutation (GSH) é reduzida, contudo a suplementação de glicina restaura a síntese do glutation melhorando sua deficiência e reduzindo o estresse oxidativo [Wang, Lu et al., 2014]. Como esse pequeno aminoácido influencia a secreção de insulina? O potencial de membrana das células beta pancreáticas é modulado por meio das vias iônicas e seus receptores, alterando dessa forma a secreção de insulina [Yan-Do, McDonald 2017] O receptor de glicina, bem como seus transportadores são altamente expressos nas células beta pancreáticas. A glicina causa nas células beta uma corrente de Cl^- , que aumenta o potencial de membrana e induz a entrada de cálcio, o qual atua no processo secretório [Tengholm, McClenaghan et al., 1992]. O gradiente de cloro nas células beta é muito alto [Yan-Do, McDonald 2017], o que faz com que a abertura do receptor de glicina cause uma despolarização com saída do cloro e não sua entrada como ocorre nos neurônios onde há uma hiperpolarização.

INTERAÇÕES DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS COM OUTROS

TECIDOS

Como já vimos anteriormente, o sensor de glicose mais bem estudado é o controle da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, em resposta a elevação dos níveis de glicose circulante. Esse sistema sensor depende, da captação e do metabolismo da glicose, seguido pela

despolarização da membrana plasmática, indução do influxo de cálcio e exocitose dos grânulos de insulina. A insulina exerce seus efeitos biológicos em outros tecidos, através de receptores, porém outros órgãos interagem com o pâncreas para modular a secreção de insulina.

EIXO CÉREBRO-ILHOTAS

Um dos órgãos que interagem com o pâncreas é o cérebro, formando o eixo cérebro-células beta pancreáticas. A presença de insulina e seu receptor no cérebro sugere que a insulina circulante atravessa a barreira sangue/cérebro [Gerozissis 2003; Pagotto 2009]. Atuando por meio de receptores específicos, a insulina participa na sinalização cerebral envolvidos na regulação de vários processos vitais, sendo responsável pelo funcionamento apropriado do sistema nervoso central [Gerozissis 2003; Bruning, Gautam et al., 2000; Schulingkamp, Pagano et al., 2000; Pagotto 2009; Wasilewska, Adamic 2012]. Receptores de insulina são distribuídos dentro do cérebro humano incluindo o hipotálamo, córtex cerebral e cerebelo [Hopkins, Williams G 1997]. Após a formação do complexo insulina/receptor a tirosina quinase é ativada e inicia uma cascata de eventos intracelulares semelhantes àqueles observados na periferia [Gerozissis 2003; Bruning, Gautam et al., 2000; Schulingkamp, Pagano et al., 2000]. O efeito da sinalização de insulina no cérebro diz respeito a ingestão de alimentos e gasto de energia. A insulina administrada no terceiro ventrículo de roedores reduz a ingestão de alimentos, pela diminuição da expressão de neuropeptídeos orexígenos (neuropeptídeos que aumentam o apetite), o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado a agouti (AgRP) e aumenta a expressão de peptídeos anorexígenos (peptídeos que reduzem o apetite), propiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por anfetaminas e cocaína (CaRT) no núcleo caudado ou arqueado. Em camundongos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, foi observado aumento de NPY e AgRP e diminuição de POMC e CaRT, no hipotálamo [Schwartz, Woods et al., 2000; Bruning, Gautam et al., 2000]. Neuropeptídeos são pequenas sequências de amino ácidos, que funcionam direta ou indiretamente para modular a atividade sináptica. Além disso, podem funcionar como neurotransmissores primários. São sintetizados como precursores, os quais sofrem procedimentos pós-tradução ou modificações para fornecer peptídeos maduros. Ao lado de sua liberação nas sinapses, os neuropeptídeos, também atuam como hormônios, isto é, moléculas de sinalização de longo alcance [Li, Kim 2009]. No cérebro a insulina interage tanto com os peptídeos orexígenos, quanto com os peptídeos anorexígenos, no controle da alimentação, do peso corporal e homeostase energética [Gerozissis 2004]. O mecanismo que regula os efeitos da insulina no cérebro é semelhante àqueles dos tecidos periféricos [Heidenreich, Zahniser et al., 1983; Raizada, Shemer et al., 1988; Schulingkamp, Pagano et al., 2000]. Uma das vias de sinalização intracelular de insulina mais estudada nos tecidos periféricos, envolve a ativação do sistema enzimático receptor de substrato de insulina e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) [Saltiel, Kahn 2001; Shepherd, Withers, Siddle 1998; Gerozissis 2004]. O efeito anorexigênico da insulina se deve em parte, da ativação de PI3K (fosfatidil Inositol-3-quinase) dependente do canal de KATP nos neurônios hipotalâmicos, que hiperpolariza e inativa o neurogênio orexígeno [Kronner, Janoscher et al., 2007].

As ilhotas pancreáticas são inervadas pelos dois ramos do sistema nervoso central, o sistema parassimpático e o simpático. As terminações parassimpáticas, contém acetil-colina e neuropeptídeos como o peptídeo vaso intestinal (VIP), o peptídeo liberador de gastrina, os quais ligam a receptores específicos das ilhotas beta. Já as terminações do sistema nervoso simpático, contém norepinefrina, bem como os neuropeptídeos Y (NPY) e galanina. Nas células alfa a norepinefrina liga o receptor beta adrenérgico, que estimula a secreção de glucagon, enquanto nas células beta liga os receptores alfa adrenérgicos, que inibem a secreção de insulina [Ahrens 2000]. A percepção direta da glicose por neurônios hipotalâmicos pode acelerar a secreção de insulina observado pelo aumento da insulina plasmática [Guillod-Maximin, Lorsignol et al., 2004]. Os

neurônios responsivos a glicose, estão largamente distribuídos no hipotálamo e são classificados em dois grupos: (1) aqueles que são despolarizados pela glicose (neurônios excitados) e (2) aqueles que são hiperpolarizados pela glicose (neurônios inibidores) [Levin, Routh et al., 2004; Beall, Ashford, McCrimmon 2012; Watts, Donovan 2010]. O neuropeptídeo Y é um peptídeo formado por 36 amino ácidos, que ocorre nas fibras nervosas periféricas e que exerce um poderoso efeito vasoconstritor [Potter 1988]. Expresso nas fibras nervosas simpáticas, o NPY reduz a liberação de insulina [Vettor, Pagano et al., 1998; Moltz, McDonald 1985; Morgan, Kulkani et al., 1998; Pettersson, Ahren et al., 1987; Schwetz, Ustione, Piston 2013], enquanto a perda da ação inibidora do NPY resulta numa elevada secreção basal de insulina estimulada pela glicose, bem como aumentada massa das ilhotas [Imai, Patel et al., 2007]. O neuropeptídeo Y (NPY) é um peptídeo orexígeno, que regula a homeostase da energia e estimula o ganho de peso [Stanley, Anderson et al., 1989]. Como o potencial redox celular é aumentado pelo NPY, significando que o metabolismo está ativado, admite-se que a inibição da secreção de insulina pelo NPY não é regulada pela inibição do metabolismo [Schwetz, Ustione, Piston 2013]. A ligação do NPY ao seu receptor (GPCRY) causa a ativação da subunidade $G_{i\alpha}$ que bloqueia a ativação da adenilato ciclase, inibindo a via do cAMP [Morgan, Kulkani et al., 1998].

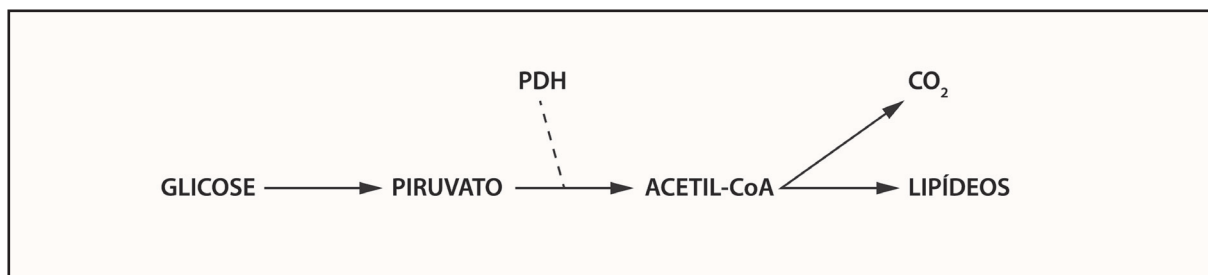
EIXO FÍGADO-ILHOTAS

O fígado é um órgão que desempenha uma função importante, isto é, a manutenção da homeostase da concentração da glicose sanguínea (5 mM ou 90 mg/dL), para que esse metabolito possa suprir as necessidades do cérebro, visto ser o combustível primário para esse órgão. Quando a concentração de glicose cai abaixo desse nível, que ocorre durante o exercício físico ou então bem após o processo digestivo, o fígado libera glicose para a corrente sanguínea, um processo intermediado pelo glucagon, da seguinte maneira: (a) as baixas concentrações de glicose são percebidas pelo pâncreas, que através das células alfa libera o hormônio glucagon; (b) o glucagon ligando ao seu receptor de superfície celular promove a ativação da enzima adenilato ciclase, que catalisa a conversão de ATP para cAMP; (c) o aumento da concentração de cAMP [cAMP], resulta na mobilização de glicogênio (glicogenólise) produzindo a glicose-6-fosfato (G-6-P) e (d) sendo a membrana plasmática impermeável a G-6-P, este metabolito é hidrolisado no lúmen do retículo endoplasmático pela glicose-6-fosfatase liberando a glicose e o fosfato. A glicose liberada vai para a corrente sanguínea.

Após a ingestão de alimentos, a concentração de glicose no sangue aumenta estimulando a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e a resultante hiperinsulinemia inicia uma série de respostas metabólicas para o retorno da concentração normal de glicose sanguínea [DeFronzo 1988]. O aumento da concentração da insulina plasmática juntamente com o aumento da concentração de glicose, resulta na inibição da secreção de glucagon [Cherrington 1999]. A manutenção da homeostase normal da glicose, após a ingestão de alimentos requer quatro efeitos coordenados da insulina [DeFronzo 1998; Bergman, Lier 2017; Norton, Shannon et al., 2022], (1) a supressão da produção endógena de glicose; (2) estimulação da captação de glicose pelo fígado; (3) estimulação da captação de glicose pelos tecidos periféricos, primariamente o músculo; (4) inibição da lipólise, com o resultante declínio da concentração de ácidos graxos e glicerol plasmático. No fígado a insulina promove a captação de glicose, bem como o seu armazenamento sob a forma de glicogênio, ativando a enzima glicogênio sintase fosfatase, a qual por sua vez ativa a glicogênio sintase pela desfosforilação [Cherrington 1999; Rui 2014]. A insulina suprime a localização do fator nuclear de transcrição foxo-1 e como consequência a insulina suprime a expressão de mRNA de genes que codificam aa glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) [Nakae, Kitamura et al., 2001; Sasaki, Cripe et al., 1984; Streeper, Svitel et al., 1997]. Como visto anteriormente, a glicose-6-fosfatase

catalisa a reação de hidrólise da glicose-6-fosfato produzindo glicose e fosfato, enquanto a fosfoenolpiruvato carboxiquinase catalisa a reação em que o fosfoenolpiruvato (PEP) é formado a partir do oxalacetato, uma reação importante na gliconeogênese. A insulina realiza um papel de regulador negativo de algumas enzimas gliconeogênicas do fígado. Assim, o destino do piruvato, que é formado pela glicólise, é controlado pelo fluxo através da piruvato carboxilase (PC) que pela carboxilação do piruvato forma o oxalacetato, que segue a via gliconeogênica. Esta reação é um exemplo de reação anaplerótica. Por outro lado, a piruvato desidrogenase direciona o piruvato para acetil-CoA e oxidação e lipogênese (Figura 9.4).

Figura 9.4 - Destino do piruvato na reação catalisada pelo piruvato desidrogenase (PDH)



A atividade da piruvato desidrogenase é inibida pela piruvato desidrogenase quinase, cuja expressão é suprimida pela insulina no estado alimentar, favorecendo a oxidação da glicose pelo fígado [Jones, Yeaman et al., 1992; Norton, Shannon et al., 2022]. O complexo PDH é inibido pelos seus produtos imediatos, a acetil-CoA e o NADH e covalentemente por fosforilação, pela piruvato desidrogenase quinase e desfosforilação pela piruvato fosfatase. Por outro lado, o pâncreas ou a secreção de insulina são influenciados por fatores derivados das células hepáticas, isto é, os fatores nucleares hepatócitos. Os fatores hepatócitos nucleares, também chamados fatores de transcrição são expressos além do fígado, no pâncreas e rins e são classificados em 4 famílias a saber: HNF-1, Foxa (ou HNF-3), HNF-4 e HNF-6, cada um caracterizado por regiões distintas correspondendo a domínios funcionais [Lau, Ng et al., 2018]. O fator nuclear hepatócito-1 (HNF-1) é um fator de transcrição que é requisitado para a secreção de insulina, bem como, a manutenção do número de células beta pancreáticas [Sato, Rahman et al., 2020]. O HNF-1 α , agora conhecido como fator de transcrição-1 (TCF-1) é responsável pelo tipo de diabetes chamado MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young). Este tipo de diabetes MODY é uma forma de diabetes monogênica autossômica dominante, com início antes dos 25 anos de idade e ausência de autoimunidade das células beta e danos na função das células beta. Variações nos genes de HNF-1 α estão associados com danos na secreção de insulina [Uhrhammer, Fridberg et al., 1997; Chiu, Chuang et al., 2003]. Os genes dos cromossomos 20 (MODY-1), 12 (MODY-3), 19 (MODY-5) e 13 (MODY-4) são causados por mutações nos fatores de transcrição, fatores hepatócitos nucleares HNF-4 α , HNF-1 α , HNF-1 β e o fator promotor da insulina-1, IPF-1 (Insulin Promoter Fator-1) respectivamente [Yamagata, Furuta et al., 1996; Yamagata, Oda et al., 1996; Horikawa, Iwasaki et al., 1996; Stoffers, Ferrer et al., 1997].

EIXO INTESTINO-ILHOTAS

Intestino-ilhotas é outro eixo importante. Logo após a ingestão de alimentos, o intestino produz e libera vários hormônios, tais como, a proteína semelhante ao glucagon, GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose GIP (*Gastric Inhibitory Peptide*), os quais após ligação com seus receptores específicos nas células pancreáticas potencializam a secreção de insulina. Ambos são considerados incretinas. Por que incretinas? No final da década de 1920, a partir de extratos intestinais, foram isolados e purificados substâncias

capazes de abaixar o nível de glicose sanguínea, que foram denominadas incretinas (*INtestine seCRETion INSulin*) [Zunz, La Barre 1929; Yabe, Seino 2011]. Como já vimos anteriormente, hormônios incretínicos são peptídeos secretados pelo intestino, que estimulam a secreção de insulina e modulam a secreção de glucagon. A partir da verificação, que a administração oral de glicose provoca uma resposta na secreção de insulina maior do que por infusão intravenosa de glicose, o fenômeno foi denominado efeito incretínico. Dependendo do tamanho do estímulo, o efeito incretínico em humanos é responsável por até 70% da secreção de insulina induzida pela glicose. Esse fenômeno é atribuído ao fato, de que a glicose administrada por via oral promove a liberação dos hormônios incretínicos GLP-1 e GIP, das células especializadas, acoplado a absorção de glicose pelo intestino [Nauck, Meier 2016; Creutzfeldt 1979]. O GIP promove o armazenamento de energia pela ação direta sobre o tecido adiposo, bem como favorece, a formação óssea e a inibição de apoptose. O polipeptídeo semelhante ao glucagon (GLP) é gerado do proglucagon, que é processado pela prohormônio convertase 1/3 (PC1/3) [Rouille, Martin, Steiner 1995], produzindo pelas células intestinais a glicentina, a oxintomodulina, o GLP-1 e GLP-2. A prohormônio convertase é uma enzima proteolítica. As enzimas proteolíticas, que atuam nos precursores de hormônios recebem o nome de prohormônios, como é o caso da prohormônio convertase, que atua no proglucagon gerando GLP-1 e GIP. A GLP-1 bioativa é gerada do GLP-1 (1-37) e existe na circulação sob duas formas moleculares equipotentes, a GLP-1(7-37) e GLP-1(7-36) amida. A GLP-1(7-36) amida representa a maioria de GLP-1 ativa encontrado no plasma humano [Orskov, Rabenhoj et al., 1994; Drucker 2006]. Durante o jejum, as concentrações circulantes de GLP-1 e GIP são baixas, porém, até 15 minutos após a ingestão de nutrientes eles se elevam, atingindo um pico entre 30-45 minutos e retornando aos níveis basais depois de 2-3 horas [Deacon 2006; Ma, Rayner et al., 2009]. O receptor de GLP-1 humano (GLP-1R) é formado por 463 amino ácidos dispostos em sete hélices acoplados a proteínas G e é expresso nas ilhotas pancreáticas rins, pulmão, coração e sistema nervoso central [Drucker, 2006]. O GLP-1 exerce ações glicoreguladoras diminuindo a velocidade de esvaziamento gástrico e inibindo a secreção de glucagon dependente de glicose. Logo, a velocidade com que o nutriente é transferido do estômago para o intestino delgado é o principal fator determinante da secreção de GLP-1 e GIP e glicemia [Marathe, Rayner et al., 2013]. GLP-1 e GIP são rapidamente degradados pela enzima dipeptidilpeptidase-4 (DPP-4) uma serina protease [Kieffer, McIntosh, Pederson 1995; Mentlein, Gallwitz, Schmidt 1993]. Serina proteases constituem uma família de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, utilizando-se de só um resíduo de serina ativado presente em seu sítio ativo. Mesmo possuindo vários resíduos de serinas somente um é essencial para sua atividade catalítica. As extremidades N-terminal de GLP-1 e GIP são importantes na ativação dos respectivos receptores [Jornvall H, Carlquist, Kwauk et al., 1981; Adelhorst, Hedegaard et al., 1994]. A dipeptidilpeptidase-4 (DPP-4) é uma exopeptidase, isto é enzima que atua nas extremidades das cadeias polipeptídicas, liberada do endotélio vascular bem como de outros tecidos, que reconhece a extremidade N-terminal, desempenhando um papel nas atividades dos hormônios incretínicos [Mentlein, Gallwitz, Schmidt 1993]. Reconhecendo as extremidades N-terminal de GLP-1 e GIP, a dipeptidilpeptidase-4 cliva a molécula entre o segundo e o terceiro resíduo de amino ácidos gerando GLP-1 (9-36) e GIP (3-42) os quais circulam no plasma [Deacon, Johnsen, Holst 1995; Deacon, Nauck et al., 2000]. Como resultado da ação da DPP-4, a meia vida de GLP-1 e GIP na circulação é de apenas 2-3 minutos [Meier, Nauck et al., 2004]. A importância do papel da dipeptidilpeptidase-4 (DPP-4) foi evidenciado pela observação de que análogos de GLP-1 e GIP, isto é, incretinas modificadas para serem mais resistentes a clivagem pelo DPP-4, mostraram maior estabilidade in vivo, que estava associada ao efeito mais potente e duradouro [Deacon 2018; Deacon, Knudsen et al., 1998; Burcelin, Dolei, Thorens 1999]. Com a finalidade de intensificar a ação das incretinas endógenas, inibidores farmacológicos da dipeptidilpeptidase-4 foram estabelecidos para o tratamento de diabetes tipo 2. A inibição do dipeptidilpeptidase-4 possibilitaria um efeito insulínico mais efetivo, no controle da

hiperglicemia do diabetes tipo 2.

Experimentos de jejum prolongado em humanos e outros animais, revelaram alteração na dinâmica da produção e secreção de insulina, resultando um déficit relativo de insulina e deterioração da tolerância a glicose [Cahill, Herrera et al., 1966; Fery, d'Attellus, Balasse 1990; Lilavivathane, Campbell, Brodows 1978]. O conceito de que o jejum pode restringir a liberação de insulina, foi sugerido com a finalidade de prevenir a hipoglicemia [Ensinck, Vogel et al., 1997]. Esse conceito foi apoiado por estudos que identificaram proteínas G capazes de suprimir a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas [Wang, Park et al., 2011]. A restrição de nutrientes causa a secreção de decretinas, que sinalizam através de receptores acoplados a proteína G, para atenuar a secreção de insulina estimulada pela glicose, pelas células beta pancreáticas. Uma decretina: (1) deriva de fonte enteroendócrino sensível a disponibilidade de nutrientes; (2) é responsivo ao jejum ou deficiência de carboidratos e (3) suprime a produção e secreção de insulina das células que produzem a insulina [Alfa, Park et al., 2015].

A neuromedina U (NMU) é um peptídeo, primeiro isolado e purificado da medula espinhal de porco, cujo nome se deve ao seu potente efeito contrátil do útero de rato [Minamino, Kangawa, Matsuo 1985]. A NMU pode ser incluída no grupo de peptídeos anorexígenos, os quais estão envolvidos na secreção de insulina [Hanada, Teranishi et al., 2004]. A neuromedina existe sob duas formas moleculares principais, uma extendida com 23-25 amino ácidos (NMU-23 ou NMU-25) e outra truncada contendo 8 ou 9 resíduos de amino ácidos (NMU-8 ou NMU-9), na extremidade C-terminal [Mitchell, Maguire, Davenport 2009].

Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e peptídeos produzidos pelas células beta pancreáticas participam na regulação da secreção de insulina e homeostase das ilhotas [Ahrén 2009]. As proteínas G são assim denominadas por serem proteínas ligadoras de nucleotídeos guanínicos. São essenciais para o conceito estímulo-secreção. A primeira pista da importância das proteínas G em mediar as ações hormonais foi fornecido quando foi observado que a guanosina tri fosfato (GTP) era requisitada para a produção de cAMP (Rodbell, Bimbaumer et al., 1971]. As proteínas G são heterotriméricas, isto é, elas são formadas por três subunidades diferentes, as subunidades α , β e γ em ordem decrescente de peso molecular [Freissmuth, Casey, Gilman 1989; Bimbaumer 1990]. A subunidade α é a responsável pela ligação com os nucleotídeos guanínicos, GTP e GDP. Após a associação do complexo agonista-receptor com a proteína G e troca de GTP e GDP, as subunidades β , γ se dissociam do complexo heterotrimérico, permitindo a subunidade α entrar no estado ativado, quando então se acopla ao sistema efetor [Robertson, Seaquist, Walseth 1991]. O NMU tem dois receptores cognatos (GPCRs): NMUR-1 que é expresso predominantemente nos tecidos periféricos e NMUR-2 expresso no sistema nervoso central [Mitchell, Maguire, Davenport 2009; Peier, Deasi et al., 2011]. Somente, os receptores NMUR-1 são expressos nas ilhotas pancreáticas de camundongos, ratos e humanos [Zhang, Sakoda et al., 2017; Amisten, Salei et al., 2013]. Os receptores acoplados a proteína G propagam os sinais nas células através das proteínas G. Após a ligação GPCRs e proteínas G alteram suas conformações e transduzem os sinais dentro das células fazendo a ligação entre a ativação dos receptores de membrana com os efetores intracelulares [Cabrera-Vera, Van Hauwe et al., 2003]. O principal determinante da especificidade desses receptores (GPCR) é a subunidade a que tem quatro subfamílias: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha 12/13}$, $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha i}$ [Bimbaumer 1992; Bimbaumer 2007]. Todos esses tipos de proteínas G são expressos nas células beta e estão envolvidos na regulação da secreção de insulina [Zhao, Ohara-Imaizumi et al., 2010]. A supressão da secreção de insulina pelo NMU produzido pelas células beta pancreáticas, desencadeia uma disfunção mitocondrial e o estresse do retículo endoplasmático nas células pancreáticas [Santulli, Pagano et al., 2015], sendo que o receptor NMUR-1 se utiliza da sinalização da proteína $G_{\alpha 1}$ para intermediar o efeito do NMU sobre a secreção de insulina [Zhang, Sakoda et al., 2021].

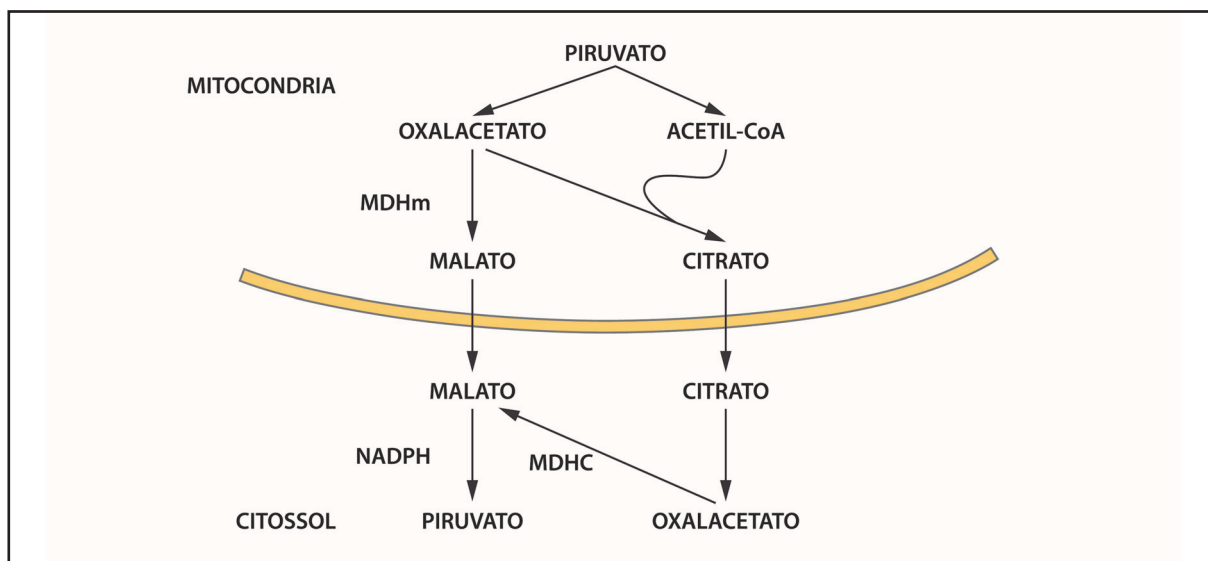
Do intestino do porco foi isolado um hormônio neuropeptídeo de 29 resíduos de amino ácidos a galanina [Tatemoto, Rokaeus et al., 1983], que é encontrada no sistema nervoso periférico e central e no sistema neuroendócrino em mamíferos [Skofitsch, Jacobowitz 1985; Dunning, Ahrén et al., 1986]. O efeito biológico da galanina é mediado por receptores, identificados sob a forma de 3 tipos, GalR-1, GalR-2 e GalR-3 [Habert-Ortoli, Amiranoff et al., 1994; Smith, Forray et al., 1997; Smith, Walker et al., 1998]. Diferentemente dos hormônios enteroendócrinos, que são de atuação sistêmica, a galanina é secretada das terminações nervosas autonômicas intrapancreáticas e exercem sua ação localmente [Dunning, Ahrén et al., 1986; Dupre 1988; Tang, Wang et al., 2012]. Considerando a via de secreção de insulina, o efeito da ação inibidora da galanina é obtida por pelo menos três sítios de ações: (1) potencializando os canais de KATP; (2) inibindo a corrente de Ca^{2+} e (3) regulando o processo exocitótico [Tang, Wang et al., 2012].

CONTRIBUIÇÃO MITOCONDRIAL PARA A SECREÇÃO DE INSULINA

O mecanismo de consenso da percepção de glicose pelas células beta pancreáticas baseia-se na síntese de ATP na mitocôndria. Após o aumento da captação de glicose pelas células beta, segue-se uma rápida glicólise com a formação de piruvato, que vai para a mitocôndria ativando o ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons e a consequente produção de ATP [Ashcroft, Rorsman 2012]. Como visto anteriormente, o aumento da síntese de ATP causa o aumento da relação ATP/ADP citossólico, que por sua vez acarreta o fechamento do canal de K^+ sensível ao ATP (KATP) e ao mesmo tempo ativa o canal de Ca^{2+} dependente de voltagem, com a entrada de Ca^{2+} e o aumento de sua concentração intracelular estimula a exocitose dos grânulos de insulina. A secreção de insulina estimulada pela glicose por sua vez é facilitada pelo aumento da concentração do equivalente redutor NADPH citossólico, visto que várias pontes redox (redox shuttles), que afetam o metabolismo gerando NADPH. Considerando, que as células betas pancreáticas, que secretam a insulina expressam baixos níveis da enzima lactato desidrogenase [Sekine, Cirulli et al., 1994], o metabolismo do piruvato na mitocôndria se reveste de muita importância para a secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS). Por outro lado, a expressão em excesso da lactato desidrogenase (LDH) nas células beta atenuam a secreção de insulina estimulada pela glicose [Ainscow, Zhao, Rutter 2000]. A reação de carboxilação do piruvato nas células beta, pela piruvato carboxilase (PC) é mantida alta para sustentar o metabolismo anaplerótico. O oxalacetato formado pela reação da piruvato carboxilase é convertido a malato pela malato desidrogenase mitocondrial (MDHm). O malato, então atravessa a membrana mitocondrial para o citossol onde pela ação da enzima málica (ME-1) forma o piruvato, criando ao mesmo tempo o NADPH. O piruvato derivado do oxalacetato pode se condensar com o acetil-CoA formando o citrato, que é transferido para o citossol. No citossol, o citrato pela ação da ATP-citrato liase (ACL) forma a acetil-CoA e o oxalato. Este último é convertido a malato pela malato desidrogenase citossólica (MDHc). No citossol, o malato é convertido, pela enzima málica (ME-1), a piruvato gerando mais NADPH, o qual diferentemente do NADH que é encontrado principalmente na mitocôndria, o NADPH é encontrado majoritariamente no citossol. O papel do NADPH como fator de acoplamento na secreção de insulina é substanciado por experimentos, que mostraram estimulação direta na exocitose de insulina após adição de NADPH [Ivarsson, Quintens et al., 2005]. O NADPH citossólico é também produzido pela reação catalisada pela isocitrato desidrogenase citossólica (ICDc). Evidências apontam que o “*knockdown*” de ICDc, bloqueia completamente a secreção de insulina estimulada pela glicose. O ICDc converte o isocitrato em alfa-cetoglutarato e NADPH, contudo, somente a microdiálise de NADPH, mas não alfa-cetoglutarato ou NADH mimetisa o efeito amplificador de 10 mM de glicose [Ferdoussi, Dai et al.,

2015]. Esses resultados apontam para um interruptor redox, que provavelmente afeta os grupos sulfidrila de cisteínas, que é responsivo a relação NADPH/NADP. Nesse aspecto a glutatona (GSH) exerce a função de um tampão crítico nas células e a relação GSH/GSSG é diretamente relacionada com a relação NADPH/NADP, amplificando a secreção de insulina [Ferdaoussi, Dai et al,2015]. Isso mostra que a enzima isocitrato desidrogenase citossólica parece ser essencial para a amplificação da secreção de insulina estimulada pela glicose através da produção de NADPH e GSH. A figura 9.5 nos dá uma idéia do destino do piruvato na mitocôndria.

Figura 9.5 - Destino do piruvato na mitocôndria pela ponte piruvato/malato e piruvato/ citrato. PC=piruvato carboxilase; PDH=piruvato desidrogenase; MDHm = malato desidrogenase mitocondrial; MDHc = malato desidrogenase citossólico; ME-1 = enzima málica; ACL = ATP-citrato-liase



SUMOILAÇÃO

A exocitose nas células beta pancreáticas envolve a formação de complexo composto por proteína de membrana associada a vesículas (VAMP-2), sinaptotagmina e proteína-25 associada a sinaptossomo (SNP-25). As funções desses complexos de proteínas são moduladas por ligações com outras proteínas. É o que ocorre com o processo chamado SUMOilação, que modula interação proteína-proteína. Essa modificação tem o potencial de regular a secreção de grânulos de insulina [Manning-Fox, Hajmre, MacDonald 2012]. SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), são pequenas proteínas relacionadas a ubiquitina. Pertencem a família ubiquitina e regulam a função celular de várias proteínas alvos. A consequência da função biológica do processo de SUMOilação é diferente daquela da ubiquitina, muito embora sua atuação seja similar a da ubiquitina. Esta é uma proteína de 76 amino ácidos altamente conservada, que é ativada pela enzima E1 tendo como cofator o ATP, formando o complexo AMP-ubiquitina. A ubiquitina é então passada para a enzima E2 e posteriormente a enzima E3 e desta para a proteína alvo. A atuação da SUMO é semelhante a da ubiquitina, com o envolvimento das três enzima (E1, E2 e E3) porém a consequência biológica é diferente. Enquanto, a ubiquitinação de proteínas é para servir a via degradativa, a modificação pelo SUMO envolve alvos de proteínas nucleares, a formação de estrutura subcelular e a regulação da transcrição [Kim, Baek, Chung 2002]. A SUMOilação regula negativamente a secreção de insulina estimulada pela glicose [Dai, Plummer et al., 2011], sendo que essa regulação negativa é revertida pela expressão de protease específica para SUMO (SENP-1). O “*knockdown*” de SENP-1 em humanos aboliu quase completamente a amplificação da exocitose estimulada pela glicose [Dai, Baek et al., 2011]. As alterações que ocorrem no processo de SUMOilação dependentes de glicose, requer NADPH e GSH [Ferdaoussi, Dai et al., 2015].

BIBLIOGRAFIA GERAL

Devlin TM (editor). Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 7th edition, John Wiley & Sons, Inc 2011

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (editors). *Biochemistry*, 5th edition. WH Freeman and Company 2002.

Voet D, Voet JG (editores). *Biochemistry*, 2th edition, John Wiley & Sons, Inc 1995.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Adelhorst K, Hedegaard BB, Knudsen LB, Kirk O 1994. Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem* 269: 6275-8.

Ahrén B 2000. Autonomic regulation of islet hormone secretion-implication for health and disease. *Diabetologia* 43: 393-410.

Ahrén B 2009. Islet G-protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 8: 369-85.

Ainscow EK, Zhao C, Rutter GA 2000. Acute overexpression of lactate dehydrogenase A perturbs β cell mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Diabetes* 49: 1149-55.

Alfa RW, Park S, Skelly KR et al., 2015. Suppression of insulin production and secretion by a incretin hormone. *Cell Metab* 21:323-33.

Amisten S, Salehi A, Rorsman P, Jones PM, Persaud SJ 2013. An Atlas and functional analysis of G-protein-coupled receptors in human islets of Langerhans. *Pharmacol Ther* 139: 359-91.

Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta cells. *Nature* 312: 446-8.

Ashcroft FM, Rorsman P 1990. ATP sensitive K^+ channels: a link between beta cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 18: 109-11.

Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammala C, Bokvist K, Rorsman P 1994. Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* 55 (supl) :54-6

Ashcroft FM, Rorsman P 2012. Diabetes mellitus and the beta cell: The last 10 years. *Cell* 148: 1160-71.

Atkinson MA, Campbell-Thompson M, Kusmartseva I, Kaestner KH 2020. Organisation of the human pancreas in health and diabetes. *Diabetologia* 63: 1966- 73.

Baggio LL, Drucker DJ 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterol* 132: 2131-57.

Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D et al., 1998. PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* 282: 1141-4.

- Beall C, Ashford ML, McCrimmon RJ 2012 The physiology and pathophysiology of neural control of the counterregulatory response. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R 215-23.
- Benito-Vicente A, Jebari-Benslaïman S, Galicia-Garcia U, Larrea-Sebal A, Uribe KB, Martin C 2021. Molecular mechanisms of lipotoxicity induced pancreatic β cell dysfunction. *Int Rev Cell Mol Biol* 359: 357-402.
- Bergman RN, Lyer MS, 2017. Indirect regulation of endogenous glucose production by insulin: the single gateway hypothesis revisited. *Diabetes* 66: 1742-7.
- Berne C 1975 The oxidation of fatty acids and ketones in mouse pancreatic islets. *Biochem J* 152: 661-6.
- Birnbaumer L 1990. G proteins in signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 675-705.
- Birnbaumer L 1992. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 71: 1069-73.
- Birnbaumer L 2007. Expansion of signals transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim Biophys Acta* 1768: 772-93.
- Bosco D, Armanet M, Morel P et al., 2010. Unique arrangement of alpha and beta cells in human islet of Langerhans. *Diabetes* 59: 1202-10.
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE et al., 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53: 1087-97.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ et al., 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 22: 2122-5.
- Burcelin R, Dolei W, Thorens B 1999. Long-lasting antidiabetic effect of a dipeptidylpeptidase IV resistant analog of glucagon-like peptide-1. *Metabolism* 48: 252-8.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A, 2006 The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Nat Acad Sci USA* 103: 2334-9.
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO et al., 2003. Insights into G protein structure, function and regulation. *Endocrinol Rev* 24: 765-81.
- Cahill GF Jr, Herrera MG, Morgan AP et al., 1966. Hormone-fuel interrelationship during fasting. *J Clin Invest* 45: 1751-69.
- Campbell JE, Newgard CB 2021. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Biol* 22: 142-58.
- Chen S, Ogawa A, Ohneda M, Unger RH, Foster DW, McGarry JD 1994. More direct evidence for malonyl-CoA-carnitine-palmitoyl transferase-1 interactions as a key event in pancreatic B cell signaling. *Diabetes* 43: 878-83.

Cherrington AD 1999. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 48: 1198-214.

Chiu KC, Chuang LM, Chu A, Wang M 2003. Transcription factor-1 and beta cell function in glucose-tolerant subjects. *Diabet Med* 20: 225-30.

Cline GW, Lepine RL, Papas KK, Kibbey RG, Shulman GI 2004. ¹³C NMR isotopomer analysis of anaplerotic pathways in INS-1 cells. *J Biol Chem* 279:44370-5.

Coore HG, Randle PJ 1964. Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem J* 93: 66-78.

Creutzfeldt W 1979. The incretin concept today. *Diabetologia* 16: 75-85.

Dai XQ, Baek SH, Chung CH 2011. SUMOylation regulates insulin exocytosis downstream of secretory granules docking in rodents and humans. *Diabetes* 60: 838-47.

Das R, Esposito V, Abu-Abed M, Anand GS, Taylor SS, Melacini G 2007. cAMP activation of PKA defines an ancient signaling mechanism. *Proc Nat Acad Sci USA* 104: 93-8.

Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ 1995. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Metab* 80: 952-7

Deacon CF, Knudsen LB, Madsen K, Wiberg FC, Jacobsen O, Holst JJ 1998. Dipeptidylpeptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia* 41: 271-8.

Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hucking K, Holst JJ 2000. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3571-81.

Deacon CF 2006. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul Peptides* 128: 117-24.

Deacon CF, Ahrén B 2011. Physiology of incretins in health and disease. *Rev Diabet Stud* 8: 293-306

Deacon CF 2018. Peptide degradation and the role of DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Peptides* 100: 150-7.

DeFronzo RA 1988. Lily Lecture 1987. The triumvirate, beta cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37: 667-87.

Delmeire D, Flamez D, Hinke SA, Cali JJ, Pipeleers D, Schuit F 2003. Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/ generator for glucose and GLP-1. *Diabetologia* 46: 1383-93.

Detimary P, Van der Berghe G, Henquin JC 1996. Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J Biol Chem* 271: 20559-65.

- Ding W, Gromada J 1997. Protein-Kinase A dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta cells by glucose dependent Insulinotropic polypeptide. *Diabetes* 46: 615-21.
- Dodson G, Steiner D 1998. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Bi* 8: 189-94.
- Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M 2010. Electrophysiology of islet cells. *Adv Exp Med Biol* 654:115-63.
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF 1987. Glucagon-like peptide-1 stimulates insulin gene expression and increases cAMP levels in islet cell line. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 3434-8.
- Drucker DJ 2006. The biology of incretins. *Cell Metab* 3:153-65.
- Dunning BE, Ahrén B, Veith RC et al., 1986. Galanin: a novel pancreatic neuropeptide. *Am J Physiol* 251: E127-33.
- Dupre J 1988 Galanin: a selective inhibitor of insulin release secretion? *Pancreas* 3: 119-21
- Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC 1973. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 826-8.
- Elahi D, Andersen DK, Brown JC et al., 1979. Pancreatic alpha and beta cell responses to GIP infusion in normal man. *Am J Physiol* 237: E185-91.
- Ensink JW, Vogel RE, Laschansky EC et al., 1997. Endogenous somatostatin-28 modulates postprandial insulin secretion. Immunoneutralization studies in baboons. *J Clin Invest* 100: 2295-302.
- Farfari S, Schulz V, Corkey B, Prentki M 1999. Glucose regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta cells: possible implications of pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49: 718-26.
- Ferdaoussi M, Dai X, Jensen MV et al., 2015. Isocitrate-to-SEN1 signalling amplifier insulin secretion as rescues dysfunctional β cells. *J Clin Invest* 125: 3847-60.
- Fery F, d'Attellis NP, Balasse EO 1990. Mechanisms of starvation diabetes: study with double tracer and indirect calorimetry. *Am J Physiol* 259: E770-7.
- Fiehn O, Garvey WT, Newman JW et al., 2010. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS One* 5: e15234 doi. Org 10.1371.
- Freissmuth M, Casey PJ, Gilman AG 1989. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J* 3: 2125-31.
- Fu Z, Gilbert ER, Liu D 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 9: 25-53.

Furman B, Ong WK, Pyne N 2010. Cyclic AMP signalling in pancreatic islets. *Adv Exp Med Biol* 654: 281-304.

Furman B, Pyne N, Flatt P, O'Harte F 2004. Targeting beta cell cyclic 3',5' adenosine monophosphate for the development of novel drugs for treating type 2 diabetes mellitus. A Review. *J Pharm Pharmacol* 56: 1477-92.

Gaisano HY 2017. Recent new insights into the role of SNARE and associated proteins in insulin granule exocytosis. *Diabetes Obes Metab* 19 (supl 1): 115-23.

Gerozissis K 2003 Brain insulin: regulation mechanisms of action and function. *Cell Mol Neurobiol* 23: 1-29.

Goke B 2008. Islet cell function: alpha and beta cells- partners towards normoglycaemia. *Int J Clin Pract (Supl)* 159: 2-7.

Grill V, Qvigstad E 2000 Fatty acid and insulin secretion. *Br J Nutr* 83 (supl 1): S79-84.

Grodsky GM, Batts AA, Bennet LL, Vcella C, McWilliams NB, Smith DF 1963. Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *Am J Physiol* 205: 638-44.

Gromada J, Bokvist K, Ding W, Holst J, Nielsen J, Rorsman P 1998. Glucagon like peptide-1 (7-36) amide stimulates exocytosis in human pancreatic beta cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. *Diabetes* 47: 57-65.

Guillod-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, Penicaud L 2004. Acute intracarotid glucose injections towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose sensing in rats. *J Neuroendocrinol* 16: 464-71.

Gutierrez-Aguillar R, Woods SC 2011. Nutritional and L and K enteroendocrine cells. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18(1): 35-41.

Habert-Ortoli E, Amiranoff B, Loquet I, Laburthe M, Mayaux JF 1994. Molecular cloning of a functional human galanin receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 9780-3.

Hanada R, Teranishi H, Pearson JT et al., 2004. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med* 10: 1067-73.

Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D et al., 2009. Somatostatin secreted by islet delta- cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58: 403-11.

Hedskov CJ, 1980. Mechanisms of glucose induced insulin secretion. *Physiol Rev* 60: 442-509.

Heidenreich KA, Zahniser NR, Berhanu P, Brandenburg D, Olefsky JM 1983. Structural differences between insulin receptors in brain and peripheral target tissues. *J Bio Chem* 258: 8527-30.

Henquin JC 2009. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52: 739-51.

Holst JJ 2007. The physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev* 95: 513-48.

Holz GG 4th, Leech CA, Habener JF 1995. Activation of a cAMP regulated Ca^{2+} signaling pathway in pancreatic beta cells by insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem* 270: 17749-57.

Hopkins DF, Williams G 1997. Insulin receptors are widely distributed in human brain and bind human and porcine insulin with equal affinity. *Diabet Med* 14: 1044-50.

Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M et al., 1997. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1 b gene (TCF-2) associated with MODY. *Nature Genet* 17: 384-.5

Husain S, Thrower E 2009. Molecular and cellular regulation of pancreatic acinar cell function. *Curr Opin Gastroenterol* 25: 466-71.

Imai Y, Patel HR, Hawkins EJ, Doliba NM, Matschinsky FM, Ahima RS 2007. Insulin secretion is increased in pancreatic islets of neuropeptide Y deficient mice. *Endocrinol* 148: 5716-23.

Immenshahidi M, Hossenzadeh H 2022. Effect of glycine on metabolic syndrome components: a review. *J Endocrinol Invest* 45: 927-39.

In't Veld P, Marichal M 2010. Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans. *Adv Exp Med Biol* 654: 1-19.

Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S et al., 2005. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes* 54: 2132-42.

Jain R, Lammert E 2009. Cell-cell interaction in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 11 (supl 4): 159-67.

Jones MJ, Yeaman SJ, Sugden MC, Holness MT 1992. Hepatic pyruvate dehydrogenase kinase activities during the starved to fed transition. *Biochim Biophys Acta* 1134: 164-8.

Jornvall H, Carlquist M, Kwauk S et al., 1981. Amino acid sequence and heterogeneity of gastric inhibitory polypeptide (GIP). *FEBS Lett* 123: 205-10.

Jouvet N, Stall JL 2017. The pancreas: bandmaster of glucose homeostasis. *Exp Cell Res* 360: 19-23.

Kang G, Chepurny OG, Malester B et al., 2006. cAMP sensor Epac as a determinant of ATP sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* 573: 595-609.

Kanno T, Gopel SO, Rorsman P, Wakui M 2002. Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha, beta and delta cells of the pancreatic islet. *Neurosci Res* 42: 79-90.

Keane K, Newshome P 2014. Metabolic regulation of insulin secretion. *Vitam Horm* 95: 1-33.

- Khan BB, Alquier T, Carling S, Hardie DG 2005. AMP activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25.
- Kieffer TJ, McIntosh CS, Pederson RA 1995. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide-1 in vitro and in vivo by dipeptidylpeptidase IV. *Endocrinol* 136: 3588-96.
- Kilimnik G, Jo J, Perival V, Zielinski MC, Hara M 2012. Quantification of islet size and architecture. *Islets* 4: 167-72.
- Kim KI, Baek SH, Chung CH 2002. Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological functions. *J Cell Physiol* 191: 257-68.
- Kim W, Egan JM 2008. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes. *Pharmacol Rev* 60: 470-512.
- Kronner AC, Janoschek R, Plum L et al., 2007. Insulin action in AgRP expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 5: 438-49.
- Lau HH, Ng NHJ, Loo LSW, Jasmen JB, Teo AKK 2018. The molecular functions of hepatocyte nuclear factors. In and beyond the liver. *J Hepatol* 68: 1033-48.
- Leech CA, Chepurny OG, Holz GG 2010. Epac-2 dependent rap-1 activation and the control of islet insulin secretion by glucagon-like peptide. *Vitam Horm* 84: 279-302.
- Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA 2004. Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes* 53: 2521-8.
- Li S, Tsalkova T, White MA, et al., 2011. Mechanism of intracellular cAMP sensor EPAC-2 activation: cAMP induced conformational changes identified by amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (DXMS). *J Biol Chem* 286: 17889-93.
- Li C, Kim K 2009. Neuropeptides. *WormBook*, 1-36 doi 10.1895/wormbook 1.142.1
- Liang Y, Matschinski FM 1991. Content of CoA esters in perfused rat islets stimulated by glucose and other fluids. *Diabetes* 40: 327-33.
- Lilavivathane U, Campbell RG, Brodows RG 1978. Control of insulin secretion during fasting in man. *Metabolism* 27: 815-21.
- Liu M, Wright J, Guo H, Xiong Yi, Arvan P 2014. Proinsulin entry and transit through the endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells. *Vitam Horm* 95: 35-62.
- Lu D, Mulder H, Zhao et al., 2002. ¹³C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 2708-13.
- Ma J, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M 2009. Insulin secretion in healthy subjects and patients with type 2 diabetes-role of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23: 413-24.

MacDonald MJ 1995. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem* 270: 20051-8.

MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ, Hasan NM, Buss JD, Kendrick MA 2005. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1-15.

Malaisse V, Malisse-Lagae F 1985 Participation of endogenous fatty acids in secretory activity of the pancreatic B cells. *Biochem J* 227: 995-1002.

Manning-Fox JE, Hajmrle C, MacDonald PE 2012. Novel roles of SUMO in pancreatic beta cell: thinking outside the nucleus. *Can J Pharmacol* 90: 765-70.

Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M 2013. Relationship between gastric emptying postprandial glycemia and incretin hormones. *Diabetes Care* 36: 1396-405.

McGarry JD, Brown NF 1997. The mitochondrial carnitine-palmitoyl-transferase system: from concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244: 1-14.

Meier JJ, Nauck MA, Kranz D et al., 2004. Secretion, degradation and eliminations of glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and health control subjects. *Diabetes* 53:654-62.

Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE 1993. Dipeptidylpeptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon like-peptide-1 (7-36) amide, peptide histidine, methionine and responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 214: 829-35.

Minamino K, Kangawa K, Matsuo H 1985. Neuromedin-8 and U-25: novel uterus stimulating and hypertensive peptides of identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 1078-85.

Mitchell JD, Maguire JJ, Davenport AP 2009. Emerging pharmacology and physiology of neuromedin U and structurally related peptide neuromedin S. *Br J Pharmacol* 158: 87-103.

Moens K, Heimberg H, Flamez D et al., 1996. Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide-1, and glucose dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes* 45: 257-61.

Moltz JH, McDonald JK 1985. Neuropeptide Y: a direct and indirect action on insulin secretion in the rat. *Peptides* 6: 1155-9.

Morgan DG, Kulkarni RN, Hurley JD et al., 1998. Inhibition of glucose stimulated insulin secretion by neuropeptide Y is mediated via the Y-1 receptor and inhibition of adenylyl cyclase in RIN 5AH rat insulinoma cells. *Diabetologia* 41: 1482-91.

Moriya R, Shirakura T, Ito J, Mashiko S, Seno T 2009. Activation of sodium glucose cotransporter-1 ameliorates hyperglycemia by mediating incretin secretion in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E 1358-65.

Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D 2001. The forkhead transcription factor Foxo-1 (FKHR) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108: 1359-67.

Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K et al., 2002. Effects of glucagon-like peptide-1 on counter-regulatory hormone responses, cognitive functions and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in health volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 129-46.

Nauck MA, Meier JJ 2016. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology and response to therapeutic interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol* 4: 525-36.

Nolan CJ, Madiraju MSR, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M 2006 Fatty acid signaling in the B cell and insulin secretion. *Diabetes* 55 (supl 2): S16-23.

Norton L, Shannon C219 doi. 10.1038., Gastaldelli A, DeFronzo RA 2022. Insulin: the master regulator of glucose metabolism. *Metab Clin Exp* 129: 155142 doi.org 10.1016/j.metab2022.155142.

Order PV, Wu B, Liu Y, Han W 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med* 48: e

Orskov C, Rabenhoj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ 1994. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine extended glucagon-like peptide-1 in humans. *Diabetes* 43: 535-9.

Owen OE, Kahlan SS, Hanson RW 2002. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277: 30409-12.1

Pagotto U 2009. Where does insulin resistance start? The brain. *Diabetes Care* 32: S174-7.

Peier AM, Desai K, Hubert J et al., 2011. Effect of peripherally administered neuromedin U on energy and glucose homeostasis. *Endocrinol* 152: 2644-54.

Pettersson M, Ahren B, Lundquist I, Botcher G, Sundler F 1987. Neuropeptide Y-intrapancreatic neuronal localization and effects on insulin secretion in the mouse. *Cell Tissue Res* 248: 43-8.

Prentki M, Vischer S, Glennon MC, Regazzi R, Deeney JT, Corkey BE 1992. Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient induced insulin secretion *JBC* 267: 5802-10.

Potter EK 1988. Neuropeptide Y as an autonomic neurotransmitter. *Pharmacol Ther* 37: 251-73.

Prentki M 1996. New insights into pancreatic beta cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J endocrinol* 134: 272-86.

Psichas A, Reimann F, Gribble FM 2015. Gut chemosensing mechanisms. *J Clin Invest* 125: 908-17.

Pyne NJ, Furman BL 2003. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in pancreatic islets. *Diabetologia* 46: 1179-89.

Raizada MK, Shemer J, Judkins JH, Clarke DW, Masters BA, LeRoith D 1988. Insulin receptors in the brain: structural and physiological characterization. *Neurochem Res* 13: 297-303.

- Ramos LS, Zippin JH, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR 2008. Glucose and GLP-1 stimulate cAMP production via distinct adenylyl cyclase in INS-1E insulinoma cells. *J Gen Physiol* 132: 329-38.
- Reimann F, Gribble FM 2016. Mechanisms underlying glucose dependent insulinotropic polypeptide and glucagon like peptide-1 secretion. *J Diabetes Invest* 7: 13-9.
- Renstrom E, Eliasson L, Rorsman P 1997. Protein kinase A- dependent and - independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic beta cells. *J Physiol* 502 (Pt 1):105-18.
- Rezaei R, Wang W, Wu Z et al., 2013. Biochemical and physiological bases for utilization of dietary amino acids by young pigs. *J Anim Sci Biotech* 4: 7 doi 10.1186/s2049-1891-4-7.
- Rizo J, Rosemund C 2008. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:665-74.
- Rizo J, Xu J 2015. The synaptic vesicle release machinery. *Annu Rev Biophys* 44: 339-67.
- Robertson RP, Seaquist ER, Walseth TF 1991. G proteins and modulation of insulin secretion. *Diabetes* 40:1-6.
- Rodbell M, Bimbaumer L, Pohl SL, Krans HM 1971. The glucagon sensitive adenylyl cyclase system in plasma membrane of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* 246: 1877-82.
- Roder PV, Wu B, Liu Y, Han W 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med* 48:e219 doi 10.1038/emmm.2016-6.
- Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL et al., 2011. Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab* 14: 45-54.
- Roduit R, Nolan C, Alarcon C et al., 2004. A role for malonyl-CoA/long chain pathway of lipid signaling the regulation of insulin secretion in response to both fuel and non fuel stimuli. *Diabetes* 53: 1007-19.
- Rorsman P, Ashcroft FM 2018. Pancreatic beta cell electrical activity and insulin secretion of mice and men. *Physiol Rev* 98: 117-24.
- Roscioni SS, Elzinga CRS, Schmidt M 2008. EPAC: effectors and biological functions. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377: 345-57.
- Rouillé Y, Martin S, Steiner DF 1995. Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like pro-hormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *JBC* 270: 26488-96.
- Ruderman N, Prentki M 2004. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3: 340-51.
- Rui I 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 4: 177-97.
- Sadana R, Dessauer CW, 2009. Physiological roles for G protein regulated adenylyl cyclase isoforms: insight from knockout and overexpression studies. *Neurosignals* 17: 5-22.

- Saltiel AR, Kahn CR 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
- Sandoval DA, D'Alessio DA 2015. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev* 95: 513-48.
- Santulli G, Pagano G, Sardu C et al., 2015. Calcium release channel RYR2 regulates insulin release and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 125: 1968-78.
- Sasaki K, Cripe TP, Koch SR et al., 1984. Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase. The dominant role of insulin. *J Biol Chem* 259: 1542-51.
- Sato Y, Rahman MM, Haneda M et al., 2020. HNF-1 α controls glucagon secretion in pancreatic α cells through modulation of SGLT-1. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866: 165898 doi 10.1016/j.bbadis.2020.165898.
- Schmidt M, Evelin S, Weernink PA et al., 2001. A new phospholipase- C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap-GTPase. *Nat Cell Biol* 3: 1020-4.
- Schulinkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB 2000. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 855-72.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-71.
- Schwetz TA, Ustione A, Piston DW 2013. Neuropeptide y and somatostatin inhibit insulin secretion through different mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: E 211-21.
- Seino S, Shibasaki T 2005. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP regulated exocytosis. *Physiol Rev* 85:1303-42.
- Sekine N, Cirulli V, Brown LJ et al., 1994. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* 269: 4895-902.
- Skofitsch G, Jacobowitz DM 1985. Immunohistochemical mapping of galanin like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6:509-46.
- Selbie LA, Hill SJ 1998 G protein coupled receptor cross talk: the fine tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci* 19: 87-93.
- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K 1998. Phosphoinositide-3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333: 471-90.
- Smith KE, Forray C, Walker MW et al., 1997. Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover. *J Biol Chem* 272:24612-6.
- Smith KE, Walker MW, Artymyshyn R et al., 1998. Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 273: 23321-6.

- Stanley BG, Anderson KC, Grayson MH, Leibowitz SF 1989. Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiol Behav* 46: 173-7
- Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF 1997. Early-onset type II diabetes mellitus (MODY-4) linked to IPF-1. *Nature Genet* 17: 138-9.
- Streeper RS, Svitel CA, Chapman S, Greenbaum LE, Taub R, O'Brien RM 1997. A multicomponent insulin response sequence mediates a strong expression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem* 272: 11698-701.
- Sudhof TC, Rothman JE 2009 Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474-7.
- Sugawara K, Shibasaki T, Takahashi H, Seino S 2016. Structure and functional roles of EPC-2 (RAPGEF-4). *Gene* 575: 577-83.
- Sun J, Cui J, He Q, Chen Z, Arvan P, Liu M 2015. Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes. *Mol Asp Med* 42: 105-18.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208.
- Takashina C, Tsujino I, Watanabe J et al., 2016. Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance. *Nutr Metab (Lond)* 13: 5 doi. Org 10. 1186.
- Tang G, Wang Y, Park S et al., 2012. Go2 G-protein mediates galanin inhibitory effects on insulin release from pancreatic β cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 109: 2636-41.
- Tarasov A, Dusonchet J, Ashcroft F 2004. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K^+ channel: a pas de deux. *Diabetes* 53 (supl 3): S 113-22.
- Tatemto K, Rokaeus A, Jornvall H et al., 1983. Galanin: a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164: 124-8.
- Tengholm A, Gylfe E 2017. cAMP signalling in insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab* 19 (Suppl 1): 42-53.
- Tengholm A, McClenaghan N, Grapengiesser E et al., 1992. Glycine transformation of Ca^{2+} oscillations into a sustained increase parallels potentiation of insulin release. *Biochim Biophys Act* 1137: 243-7.
- Toledo GA, Montes MA, Montenegro P, Borges R 2018. Phases of the exocytotic fusion pore. *FEBS Lett* 592: 3532-41.
- Urhmmmer S, Fridberg M, Hansen T et al., 1997. A Prevalent amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene is associated to reduced serum C peptide and insulin responses to an oral glucose challenge. *Diabetes* 46: 912-6.
- Vakilian M, Tahamtani Y, Ghaed K 2019. A review of insulin trafficking and exocytosis. *Gene* 706: 52-61.

- Vardjan N, Jorgacevski J, Zorec R 2013. Fusion pores, SNAREs and exocytosis. *Neuroscient* 19: 160-74.
- Vettor R, Pagano C, Granzotto M et al., 1998. Effects of intravenous neuropeptide Y on insulin secretion and insulin activity in skeletal muscle in normal rats. *Diabetologia* 41: 1361-7.
- Wahren J, Felig P, Cerasi E, Luft R 1972. Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J Clin Invest* 51: 1870-8.
- Walker JT, Saunders DC, Brissova M, Powers AC 2021. The human islet: mini-organ mega-impact. *Endocr Rev* 42: 605-57.
- Wang Y, Park S, Bajpayee NS et al., 2011. Augmented glucose-induced insulin release in mice lacking G(o2) but not G(o1) or Gi proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 108:1693-8.
- Wang Q, Lu K, Du H et al., 2014. Association between cytosolic serine hydroxymethyltransferase (SHMT-1) gene polymorphism and cancer risk: a meta analysis. *Biomed Pharmacother* 68: 757-62.
- Wang W, Wu Z, Dai Z et al., 2013. Glycine metabolism in animals and humans. Implications for nutrition and health. *Amino ACIDS* 45: 463-77.
- Wasilewska M, Adamiec R 2012. Cerebral regulation of insulin secretion and the development of insulin resistance in type 2 diabetes. *Adv Exp Med* 21: 695-703.
- Watts AG, Donovan CM, 2010. Sweet talk in the brain: glucosensing, neural networks and hypoglycemic counterregulation. *Front Neuroendocrinol* 31|: 32-43.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Clin Sci* 118: 843-6.
- Wu G 2010. Functional amino acids in growth, reproduction and health. *Adv Nutr* 1: 31-7.
- Wu Z, Thiyagarajan S, O'Shaughnessy B, Karatekin E 2017. Regulation of exocytosis fusion pores by SNARE protein transmembrane domains. *Front Mol Neurosci* 10: article 315 doi 10.3389.
- Yabe D, Seino Y 2011. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: Comparison of their actions in insulin secretion and β cell preservation. *Progr Biophys Mol Biol* 107: 248-56.
- Yamagata K, Furuta H, Oda N et al., 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear -4 α in maturity-onset diabetes of the young (MODY-1). *Nature* 384: 458-60.
- Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ et al., 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α in maturity-onset diabetes of the young (MODY-3) *Nature* 384: 455-8.
- Yan-Do R, MacDonald PE 2017. Impaired “Glycine”-mia in type 2 diabetes and potential mechanism contributing to glucose homeostasis. *Endocrinol* 158: 1064-73.
- Yaney GC, Corkey BE 2003. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46: 1297-312.

Zhang W, Sakoda H, Miura A et al., 2017. Neuromedin U suppresses glucose stimulated insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun* 493: 677-83.

Zhang W, Sakoda H, Nakazato Y et al., 2021. Neuromedin U uses Gai2 and Gao to suppress glucose-stimulated Ca^{2+} signaling and insulin secretion in pancreatic β cells. *PLOS One* 16(4) e0250232 doi.org 10.1371.

Zhao A, Ohara-Imaizumi M, Brissova M et al., 2010. Gao represses insulin secretion by reducing vesicular docking in pancreatic beta cells. *Diabetes* 59: 2522-9.

Zhou YP, Grill V 1995 Palmitate induced B cell insensitivity to glucose is coupled to decreased pyruvate dehydrogenase activity and enhanced kinase activity in rat pancreatic islets. *Diabetes* 44: 394-9

Zunz E, La Barre J 1929. Contribution a l'etude de variations physiologiques de la secretion interne du pancreas relations entre les secretions externe et interne du pancreas. *Arch Inte Physiol Biochim* 31: 20-44.

CAPÍTULO 10 - METABOLISMO DA GLICOSE

MONOSSACARÍDEOS

A glicose é um monossacarídeo. Monossacarídeos são carboidratos constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio. São açúcares não hidrolisáveis e são classificados em trioses (3 átomos de carbono), tetroses (4 átomos de carbono), pentoses (5 átomos de carbono), hexose (6 átomos de carbono) e heptoses (7 átomos de carbono). A glicose é uma hexose cuja fórmula $C_6H_{12}O_6$ apresenta um grupo carbonila e 5 grupos alcoólicos.

A glicose é a principal forma de absorção de carboidratos pelo trato intestinal e entregue às células corporais. É o único combustível usado por algumas células especializadas e o principal combustível para o cérebro.

METABOLISMO: CONCEITOS GERAIS

Duas questões são fundamentais para entendermos metabolismo: (1) como a célula obtém, do meio ambiente, a energia necessária para suas funções e (2) como as células sintetizam as moléculas simples e complexas para realizar as suas funções. Esses processos são efetivados por uma rede de reações químicas altamente integradas, conhecidas como metabolismo, isto é, uma série de transformações químicas ligadas, que ocorrem no organismo o cuidadosamente definido. Os organismos vivos requerem uma entrega contínua de energia livre: (1) para a realização de trabalho mecânico, na contração muscular e outros movimentos; (2) no transporte ativo de moléculas, contra um gradiente de concentração e (3) na síntese de macromoléculas a partir de precursores simples. Energia livre é aquela energia capaz de realizar trabalho. Uma série de reações enzimáticas consecutivas, visando a produção de produtos específicos são conhecidas como vias metabólicas. Existem duas classes de vias metabólicas: (1) a via catabólica ou catabolismo refere-se a quebra exergônica de produtos complexos a produtos simples. A energia liberada durante o processo é conservada sob a forma de ATP e outras moléculas ricas em energia, (2) a via anabólica ou anabolismo compreende aquelas vias que requisitam energia para a síntese de moléculas simples ou complexas. ATP e NADPH são as principais fontes de energia livre para as vias metabólicas. Portanto, as formas úteis de energia produzidos e liberados no catabolismo são usadas no anabolismo. Todos os componentes celulares se encontram num estado de equilíbrio dinâmico, ao serem sintetizados e degradados, criando uma condição estável (*steady state*) de concentração celular dessas substâncias. Tanto as vias catabólicas quanto as anabólicas são reguladas para a manutenção do equilíbrio dos intermediários e produtos químicos.

METABOLISMO BASAL

O gasto mínimo de energia para a manutenção das funções vitais é conhecido como metabolismo basal, sendo avaliado com o indivíduo em estado de repouso. Portanto, o metabolismo basal é um reflexo das necessidades energéticas de órgãos, que continuam a funcionar no estado de repouso, tais como, cérebro, rins, pulmão, coração, fígado, músculo e outros, enfim todo o organismo.

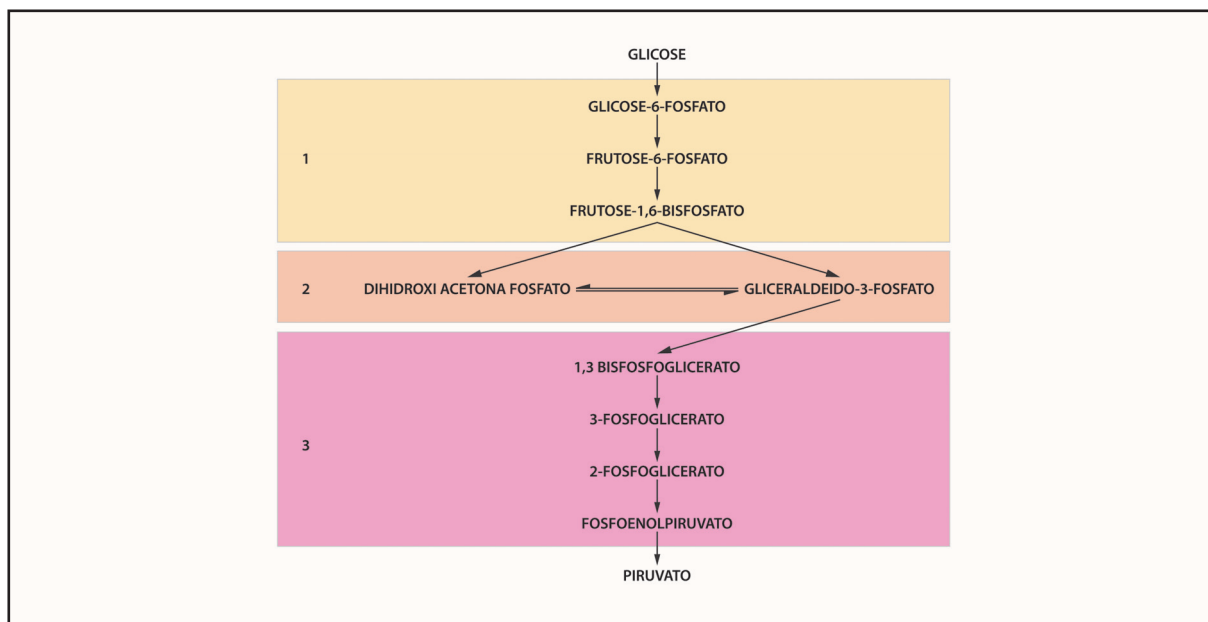
VIA GLICOLÍTICA

Em condições normais de alimentação, os carboidratos da dieta são digeridos, e o monossacarídeo resultante, a glicose é transportada para vários tecidos, sendo o combustível primário para a geração de energia sob a forma de ATP [Nordlie, Foster, Lange 1999]. Na maioria dos tecidos de mamíferos, o catabolismo da glicose a piruvato, conhecido como glicólise ou via glicolítica é preservada como a principal via metabólica na geração de ATP. A via glicolítica, é também conhecido como via de Embden-Meyerhof, é uma sequência de reações enzimáticas, que metaboliza uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, com a concomitante produção de duas moléculas de ATP. É um processo que não requer oxigênio, portanto é uma via anaeróbica. A passagem da glicose de fora para dentro da célula é feito diretamente para o citossol, por transportadores específicos (GLUT e SGLT), onde as enzimas da glicólise estão localizadas. Algumas particularidades devem ser consideradas em alguns tecidos ou células. Assim, os eritrócitos que são desprovidos de mitocôndrias, o produto final é o lactato, o qual é liberado para a corrente sanguínea. Nessas células, a glicose que é desviada para a via pentose fosfato, forma NADPH, importante para manter a glutatona no estado reduzido. No cérebro, que em condições normais só utiliza a glicose, o piruvato formado na glicólise é subsequentemente oxidado a CO_2 e H_2O , na mitocôndria. Outros tecidos como o músculo, o coração e o tecido adiposo geram ATPs nas mitocôndrias. Em condições aeróbicas, o piruvato é metabolizado a CO_2 e H_2O através do ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons. Na ausência de oxigênio o piruvato é fermentado a lactato (fermentação láctica) ou a álcool (fermentação alcoólica) formando ácido láctico e etanol respectivamente.

A via glicolítica como é conhecida hoje, começou a ser descrita por volta de 1933 através dos trabalhos de Embden (Gustav), que propôs a cisão da frutose-1,6-bisfosfato em duas trioses. Após Embden, dois outros pesquisadores Meyerhoff (Otto) e Parnas (Jakub) prosseguiram com pesquisas experimentais sobre a glicólise, desvendando as fases da degradação fosforilativa da glicose como hoje é ensinado [Barnett 2003; Cori 1983; Lenzen 2014]. A figura 10.4 mostra o caminho pelo qual a glicose é convertida a piruvato. Nesse esquema não estão incluídos os desvios que a glicose-6-fosfato pode seguir, isto é, para a síntese de glicogênio ou a via pentose fosfato, tópicos que serão abordados mais para frente.

Na via glicolítica, de glicose até piruvato, podemos considerar três estágios: (1) o primeiro estágio refere-se a uma fase preparatória ou de ativação, em que a glicose e a frutose-6-fosfato são fosforilados, com o consequente consumo de 2 ATPs; (2) o segundo estágio diz respeito a cisão da molécula de 6 átomos de carbono em duas moléculas de três átomos de carbono e (3) o terceiro estágio é a fase de reações de oxidorredução e fosforilação, onde há a formação de 4 moléculas de ATPs por molécula de glicose consumida (Figura 10.1). A glicose entra na célula transportada por transportadores específicos (GLUT e SGLT), indo para o citossol. No citossol a glicose é rapidamente fosforilada, uma reação que é catalisada pela enzima hexoquinase. Na reação há o consumo de uma molécula de ATP por molécula de glicose:

Figura 10.1 - A via glicolítica, dividido em 3 fases (1) estágio preparatório; (2) estágio de divisão e (3) estágio de oxidorredução e fosforilação



Quinases são enzimas que catalisam a transferência de grupo fosforila do ATP a umceptor. Portanto, a hexoquinase é uma quinase que catalisa a transferência de um grupo fosforila do ATP para a glicose, formando a glicose -6- fosfato. Dois efeitos resultam dessa reação enzimática: (1) a glicose-6-fosfato formada não consegue se difundir através da membrana plasmática, em razão de sua carga negativa e (2) a adição do grupo fosforila “desestabiliza” a glicose, facilitando seu metabolismo posterior. O segundo, substrato da hexoquinase é o complexo Mg-ATP. O magnésio é um metal bivalente essencial para a atividade da quinase. Relativamente ao mecanismo da reação, a glicose induz uma alteração conformacional na hexoquinase, fazendo com que o ATP fique bem próximo dos grupos da glicose, excluindo a água do sítio catalítico. Quatro isoenzimas de hexoquinases foram separados de vários tecidos de ratos, através de cromatografia troca iônica e eletroforese [Gonzalez, Ureta ET AL., 1964; Katzen, Schimke 1965]. As isoenzimas são conhecidas como hexoquinases tipo I, II, III e IV, esta última, também conhecida como glicoquinase. Essa numeração foi proposta considerando a ordem decrescente de mobilidade eletroforética, aquela isoenzima que se movimenta mais rapidamente em direção ao cátodo foi designada hexoquinase tipo 1. A constante de Michaelis -Menten dessas isoenzimas é baixo significando alta afinidade ao substrato. O Km para a glicose varia de 0,003 a 0,3 mM, enquanto para o ATP varia de 0,5 a 1,0 mM [Wilson 2003]. Segundo Wilson [Wilson 1997], existem três razões para a existência de isoenzimas: (1) as isoenzimas podem ser diferentes em suas propriedades reguladoras ou catalíticas, adequando-os para o papel metabólico; (2) diferenças na regulação transcricional das isoenzimas pode permitir sua expressão seletiva em tecidos particulares, com distintas respostas a condição metabólica, por exemplo, alterações dos efeitos hormonais ou crônicos na atividade fisiológica [Hofman, Pette 1994] e (3) diferenças na localização subcelular de isoenzimas pode resultar em compartimentalização do metabolismo da glicose, com a canalização da glicose-6-fosfato para uma determinada via metabólica [Ureta 1978; Ovádi, Srere 2000; Wilson 2003]. As isoenzimas de hexoquinase tipo I, II e III apresentam certas diferenças em alguns aspectos. Assim, todas as três isoenzimas são inibidas pelos produtos da reação, a glicose-6-fosfato, no entanto, para a isoenzima tipo 1 (HK-1) essa inibição é antagonizado pelo fosfato inorgânico (Pi), enquanto, que para as isoenzimas II e II o Pi reforça e aumenta a inibição. Outra particularidade refere-se à capacidade de interagir diretamente com a mitocôndria. As isoenzimas HK-I e HK-II se associam a mitocôndria, enquanto as isoenzimas HK-III e HK-

IV não compartilham essa propriedade. O fato de se associarem às mitocôndrias as isoenzimas HK-I e HK-II são também conhecidas como hexoquinases mitocondriais. Evidências mostram que a hexoquinase presente nas frações particuladas se encontra associada com a mitocôndria e mais especificamente com a membrana mitocondrial externa [Rose, Warms 1967; Kropp, Wilson 1970]. A interação entre a hexoquinase e mitocôndria é concretizada através da ligação da enzima com a proteína porina, também chamada VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*). A porina (VDAC) é uma proteína de 30 KDa, presente na membrana mitocondrial externa, que permite o transporte de solutos e metabolitos através do espaço intermembrana, entrando e saindo da mitocôndria [Azoulay-Zohar, Israelson et al., 2004; Colombini, Blachly-Dyson, Forte 1996; Mannella 1998].

A hexoquinase interage e promove a abertura do canal VDAC (porina), que permite a troca metabólica de adenina nucleotídeos, o ADP citossólico e ATP mitocondrial, através do transportador de adenina nucleotídeos, ANT. O acoplamento funcional entre a fosforilação oxidativa (cadeia de transporte de elétrons) é intermediado pela troca dos nucleotídeos (ADP/ATP) através de VDAC onde a ANT na membrana mitocondrial interna. O acúmulo do produto da reação, catalisada pela hexoquinase a glicose-6-fosfato promove a dissociação da hexoquinase do complexo com o VDAC, causando o fechamento do canal impedindo, consequentemente a troca de ADP/ATP [Robey, Hay 2006].

A ligação da hexoquinase com os sítios de contatos mitocondriais é cooperativa (ligação sigmoidal) hexoquinase é ativada e a ligação é realizada com a hexoquinase tetramérica [Xie, Wilson 1990]. A hexoquinase, está envolvida na prevenção da apoptose. A proteína quinase B (AKT) é também, reconhecida como um potente inibidor da apoptose, tendo sido verificado que a proteína quinase B (AKT) suprime a morte celular estimulando o deslocamento da hexoquinase à mitocôndria. O fechamento do canal VDAC leva a hiperpolarização mitocondrial, tumefação e ruptura [Newmeyer, Ferguson-Miller 2003]. Outro membro da família de hexoquinases de enzimas é a glicoquinase, também conhecida como hexoquinase IV. A glicoquinase é produzida predominantemente nas células beta pancreáticas e fígado [Walker, Rao 1964; Matschinsky, Ellerman 1968; Matschinsky, Magnuson et al., 2006; Matschinsky, Wilson 2019], embora tenha sido detectada em baixos níveis no hipotálamo, células enteroendócrinas e pituitária [Jetton, Liang et al., 1994; Kang, Dunn-Meinell et al., 2006]. A enzima glicoquinase é composta de 465 amino ácidos com uma massa molecular de cerca de 52 KDa [Sarabu, Taub, Grimsby 2007]. A estrutura tridimensional da glicoquinase compreende três domínios: domínio grande, pequeno e conectado. O domínio conectado é a principal região ativa da enzima, onde estão localizados os sítios de ligação [Matschinsky 2009]. A constante de Michaelis-Menten (K_m) da glicoquinase para seu substrato glicose é alta ($K_m \sim 8 \text{ mM}$) o que significa que a enzima apresenta baixa afinidade ao substrato. Por outro lado, a glicoquinase, diferentemente das outras hexoquinases, não é afetada pelo produto da reação a G-6-P. A baixa afinidade e a cooperatividade em relação a glicose, permite a enzima operar como um sensor fisiológico da glicose nas células em que o transporte de glicose pela membrana plasmática não é um fator limitante [Iynedjian, 2009]. Vejamos agora o conceito de sensores de metabolitos e cooperatividade. O termo sensor de metabolito é aplicado a entidade que interage diretamente com o metabolito e converte sua concentração em sinal ou sinais que são química e fisicamente diferentes do metabolito original [Matschinsky, Wilson 2009].

Por outro lado, considerando que a glicoquinase monomérica com uma simples ligação a glicose é ativa e apresenta curva sigmoide, um mecanismo de cooperatividade foi proposto, em que a glicoquinase alternaria entre uma conformação de baixa afinidade e de alta afinidade e isso envolveria uma interconversão lenta entre os estados conformacionais de glicoquinase de baixa afinidade livre de glicose para a de alta afinidade após ligação com a glicose [Kamata,

Mitsuya et al., 2004; Massa, Gagliardino, Francini 2011].

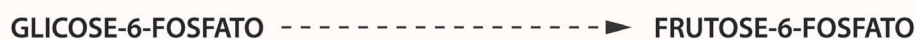
Nas células beta do pâncreas a glicoquinase é denominada de receptor de glicose. Nessas células sua principal função é a de controlar a liberação de insulina, de acordo com a concentração de glicose [Ren, Li et al., 2022]. O controle da liberação de insulina pela glicoquinase nas células beta pancreáticas pode ser assim resumido: o aumento do nível de glicose sanguíneo causa um aumento da glicose nas células beta, numa concentração que permite a reação de fosforilação da glicose catalisada pela glicoquinase, e dessa forma iniciar a via glicolítica. Isso proporciona combustível para o ciclo de Krebs (CK) e cadeia de transporte de elétrons (CTE) resultando na produção de grande quantidade de ATP. O aumento da concentração de ATP aumenta a relação ATP/ADP, que vai estimular o fechamento do canal de potássio sensível ao ATP (KATP) na membrana plasmática. Uma vez fechado o canal KATP, a membrana plasmática se torna despolarizada, permitindo a abertura do canal de cálcio dependente de voltagem e consequentemente o influxo de Ca^{2+} para dentro da célula. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} promove a fusão dos grânulos de secreção de insulina com a membrana plasmática e a liberação de insulina [Larion, Miller 2012].

Outro tecido em que a glicoquinase (HK IV) está presente é o fígado de mamíferos. A glicoquinase é uma enzima de peso molecular 50 KDa, que desempenha um papel importante na regulação do conteúdo de glicogênio nas células hepáticas. Os hormônios insulina e glucagon podem atuar no transporte citoplasmático do fígado controlando o conteúdo de glicose [Brown, Kalinowski et al., 1997]. Somente no fígado de mamíferos existe um polipeptídeo de peso molecular 68 KDa chamado proteína reguladora de glicoquinase (GKRP), que como o próprio nome diz é reguladora da enzima. A proteína reguladora pode se ligar competitivamente com a glicose e prevenir a reação de fosforilação catalisada pela enzima e regular a atividade da glicoquinase nas células hepáticas [Iglesia, Mukatar et al., 2000]. Quando a concentração de glicose for muito baixa, a glicoquinase forma um complexo com a proteína reguladora (GK-GKRP) reunido dentro do núcleo do hepatócito. O aumento da concentração de glicose promove a dissociação do complexo, deslocamento da glicoquinase para o citoplasma, aumentando os seus níveis e promovendo sua atividade catalítica [Kaminski, Schultz et al., 2014].

Em mamíferos o conteúdo do complexo GK-GKRP sofre a influência de níveis de glicose, são ativados pela frutose-6-fosfato e inibida pela frutose-1-fosfato [Pautsch, Stadler et al., 2013; Lloyd, St Jean et al., 2013]. A expressão de glucoquinase no fígado depende dos estados de jejum e realimentação. A insulina é um regulador positivo, enquanto o glucagon tem efeito oposto [Iynedjian 1993]. Por outro lado, a interação GK-GKRP constitui um mecanismo chave de controle pós-transcrição, para a atividade de glicoquinase hepática, modulado pela ligação de frutose-6-fosfato a proteína reguladora [Massa, Gagliardino, Francini 2011].

1. Isomerização da glicose-6-fosfato

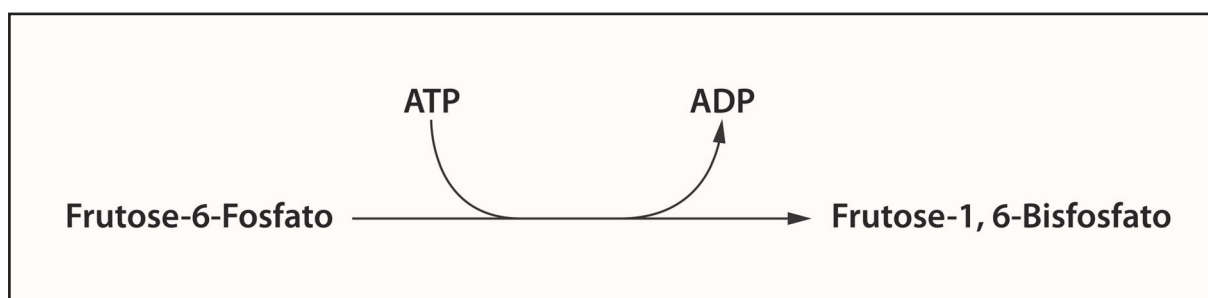
A transformação da glicose-6-fosfato para frutose-6-fosfato é uma reação de isomerização catalisada pela enzima glicose-6-fosfato isomerase.



As isomerases constituem uma classe de enzimas envolvidas no movimento de um grupo ou dupla ligação dentro da mesma molécula. Isso inclui troca de posição do grupo hidroxila e carbonila, como a conversão de glicose-6-fosfato para frutose-6-fosfato. Portanto, a conversão de glicose-6-fosfato para frutose-6-fosfato é uma isomerização que converte uma aldose em cetose. Como tanto a glicose-6-fosfato quanto a frutose-6-fosfato estão presentes na forma cíclica, a enzima deve primeiro abrir o anel da glicose, catalisar a isomerização e então promover a formação do anel de 5 membros da frutose-6-fosfato.

2. Fosforilação da Frutose-6-Fosfato

A reação catalisada de glicose-6-fosfato isomerase é uma reação reversível, de modo que, permite que as células utilizem a glicose-6-fosfato na via das pentoses e na síntese de glicogênio. Então, a frutose-6-fosfato formado nessa reação deve ser fosforilado para alterar o equilíbrio da reação catalisada pela isomerase. Isso é alcançado pela reação catalisada pela fosfofruto-1-quinase (PFK-1), ativando a via glicolítica. A PFK-1 se constitui num importante sítio regulador da via glicolítica. Ela catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bisfosfato. Vamos lembrar que o termo bisfosfato significa que os radicais fosforilas estão alocados em diferentes átomos. O ATP é um substrato da PFK-1, sendo considerado a moeda universal de energia. O alto potencial de transferência do grupo fosforila faz do ATP uma fonte de energia para as funções como contração muscular, transporte ativo e biossínteses. A hidrólise da molécula de ATP numa reação química, altera a relação entre os reagentes e produtos tornando a reação irreversível. A reação catalisada pela PFK-1 se processa da seguinte forma;

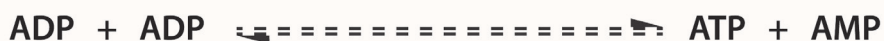


A atividade da enzima é influenciada por modificadores, que operam de tal maneira que a reação procede quando a célula requer energia e é inibida quando há excesso de energia (ATP). Em mamíferos a PFK-1 existe sob três isoformas diferentes, a saber PFK-M, PFK-L e PFK-P (ou C). Os níveis de expressão dessas isoformas são específicos aos tecidos. Assim, o músculo esquelético expressa primariamente a isoforma PFK-M, o fígado a isoforma PFK-L e as plaquetas ou cérebro a isoforma PFK-P (C). O músculo esquelético é o único tecido que expressa somente uma isoforma a PFK-M, enquanto os outros tecidos expressam níveis distintos das três isoformas [Dunaway, Kasten et al., 1988]. A enzima fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) é uma enzima reguladora da glicólise, que pode ser influenciada por fatores alostéricos negativos e positivos. A sinalização desses compostos (fatores alostéricos) são necessários para diferenciar as taxas de glicólise em resposta a alterações no estado energético.

Regulação da PFK-1 pelo Estado Energético: Neste ponto vale conceituarmos três efeitos que alteram a glicólise, a saber o efeito Pasteur, o efeito Warburg e o efeito *Crabtree*. O efeito Pasteur refere-se a inibição da utilização de glicose pelo metabolismo oxidativo mitocondrial. O efeito Pasteur chega a inibir a glicólise em cerca de 60-90% e é o principal contribuinte para o equilíbrio entre glicólise e metabolismo oxidativo mitocondrial. O efeito Warburg refere-se ao enfraquecimento do efeito Pasteur, levando a produção de lactato, mesmo na presença de

oxigênio. Esse efeito pode ser entendido como um déficit na capacidade da mitocôndria para manter a glicólise. O efeito *Crabtree* trata da supressão do metabolismo oxidativo mitocondrial pela glicólise levando a produção de lactato. Ele envolve o aumento primário do fluxo glicolítico [Felipe-Barros, Ruminot et al., 2021]. Quando a mitocôndria produz muito ATP, a carga energética da célula aumenta, aumentando a relação ATP/AMP, fato que vai inibir a glicólise. A inibição da glicólise (efeito Pasteur) é o resultado da inibição do PFK-1 pelo ATP. A PFK-1 tem dois estados de estrutura quaternária, o estado T inibido e o estado R ativado [Webb, Forouhar et al., 2015]. A conformação tetramérica da fosfofrutoquinase é a conformação ativa, que pode se dissociar em dímeros inativos [Luther, Cai et al., 1986; Aragon, Sols 1991; Paetkau, Lardy 1967; Bock, Frieden 1976]. O equilíbrio entre a conformação dimérica (estado T inativo) e a conformação tetramérica (estado R ativo) pode ser alterado por moduladores como por exemplo o citrato, que favorece a dissociação dos tetrâmeros e o ADP que estabiliza a conformação tetramérica [Hesterberg, Lee 1982]. Já o ATP tem duplo efeito sobre a estrutura da fosfofrutoquinase, em concentração estimuladora favorece a formação da conformação tetramérica, porém em concentrações inibidoras dissocia o tetrâmero em dímeros [Zancan, Marinho-Carvalho et al., 2008]. O aumento da concentração de AMP ativa a via glicolítica por dois motivos: (1) ele é um regulador positivo da PFK-1, estabilizando a conformação tetramérica, e (2) ele é um inibidor da frutose-1,6-bisfosfatase uma enzima que catalisa o reverso da reação catalisada pela fosfofrutoquinase-1.

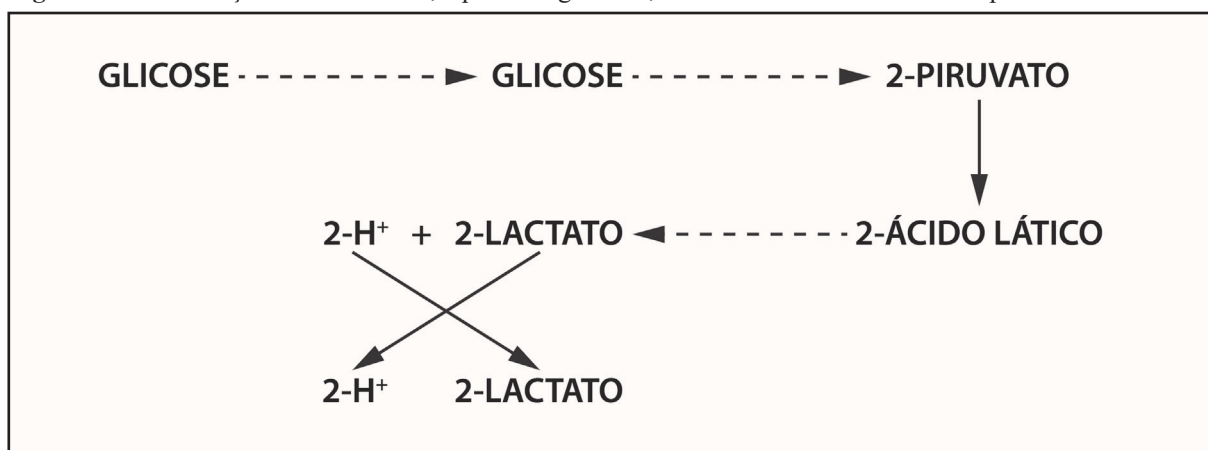
Nesta altura poderíamos perguntar: porque, o AMP é o regulador alostérico positivo da PFK-1 e não o ADP? Quando o ATP é rapidamente utilizado, a enzima adenilato quinase pode formar ATP a partir do ADP da seguinte forma:



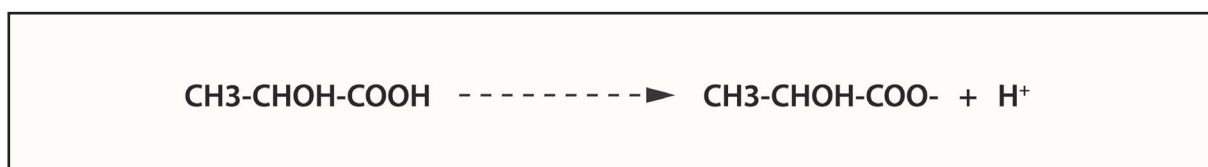
Dessa forma, algum ATP é recuperado, restando ao AMP se tornar o sinal de sinalização de baixo estado energético.

Regulação da PFK-1 pelo pH Intracelular: As propriedades cinéticas e moleculares da PFK-1 dependem da concentração hidrogeniônica intracelular [Aaronson, Frieden 1972; Pavelich, Hammes 1973; Bock, Frieden 1976]. O pH permite uma comparação de forma conveniente de soluções diferentes. Sabemos que as células corporais são sistemas aquosos, cujas reações são características e importantes. Por exemplo o pH do soro sanguíneo normal é cerca de 7,40, indicando uma reação levemente alcalina do lado da neutralidade. O corpo possui mecanismos químicos e físicos complexos para controlar o pH do sangue, de modo, que somente alterações leves possam ocorrer. Variações no pH de tecidos acompanha as variações no sangue e vice-versa. Vejamos como o potencial hidrogeniônico (pH) influencia a atividade da PFK-1. Em 1967, Paetkau e Lardy mostraram, que a enzima PFK-1 podia se dissociar em subunidades inativas e reassociar na forma ativa, abaixando e elevando o pH [Paetkau, Lardy 1967] (Figura 10.2). Por sua vez, duas outras pesquisas mostraram, que a dissociação da PFK-1 de uma forma ativa de 4 subunidades era para uma forma inativa de 2 subunidades [Aaronson, Frieden 1972; Pavelich, Hammes 1973]. Em suma, o que foi observado é que o potencial hidrogeniônico (pH) é um fator que dissocia a forma ativa tetramérica da PFK-1 para uma forma inativa dimérica.

Figura 10.2 - Formação de ácido láctico, a partir da glicólise, resultando no abaixamento do pH

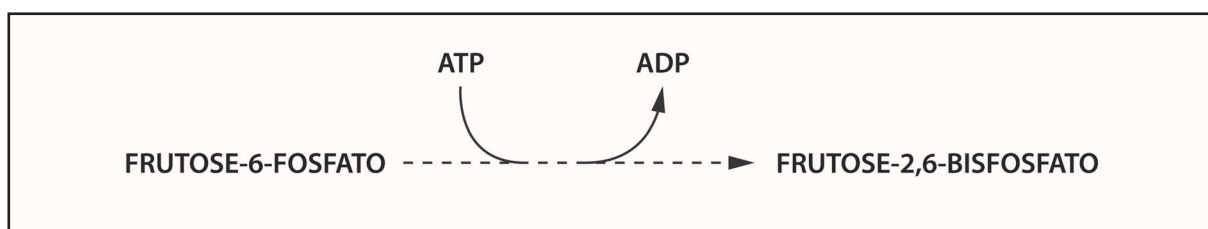


Já vimos que a glicose ao entrar na célula é rapidamente fosforilada para glicose-6-fosfato, o qual segue a via glicolítica formando ácido pirúvico ($\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$). Este ácido pirúvico pode ser reduzido a ácido láctico ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$). O ácido láctico pode se dissociar em uma base o lactato e um próton:



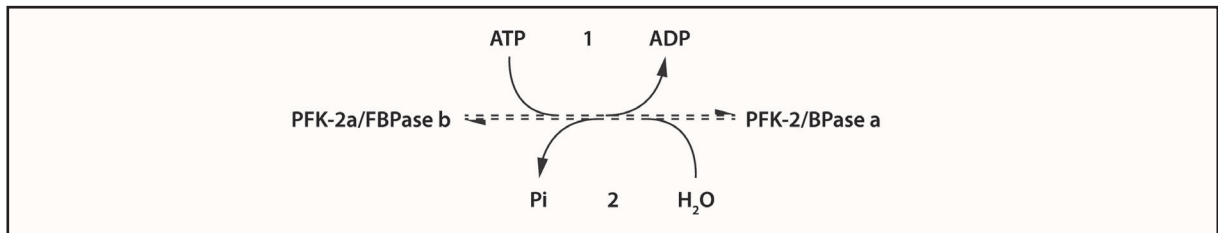
Normalmente, o ácido láctico formado, isto é, o lactato mais o próton, deve seguir para a corrente sanguínea. Se por qualquer motivo, isto não ocorrer, há o acúmulo intracelular de próton (H^+) alterando o pH devido ao aumento da concentração hidrogeniônica. O H^+ interage com a forma tetramérica da PFK-1 ativa, que se dissocia na forma dimérica inativa. Com isso há a inibição da glicólise.

Regulação da PFK-1 pela Frutose-2,6-bisfosfato: A frutose-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-BF) é uma potente molécula reguladora do metabolismo de carboidratos em praticamente todos os eucariotas. Atuando em concentrações submicromoleculares a Fru-2,6-BF intensifica a glicólise e também, a gliconeogênese. A Fru-2,6-BF é o mais potente efetor alostérico da PFK-1 e um inibidor da enzima Fru-1,6-bisphosphatase. A frutose-2,6-bisfosfato é produzida a partir da frutose-6-fosfato por uma família de enzimas homodiméricas conhecidas como fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bisfosfatase. Esta é uma enzima bifuncional responsável tanto pela fosforilação da frutose-6-fosfato dependente de ATP para Fru-2,6-BF pela atividade quinase da PFK-2 quinase, quanto a desfosforilação da frutose-2,6-BF para Frutose-6-fosfato através da atividade fosfatase, FBPase.



A família é composta por quatro isoformas: PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB-4 que apresentam atividades iguais para a quinase e fosfatase e a PFKFB-3 que tem alta atividade quinase e nenhuma fosfatase [Okar, Lange 1999; Okar, Manzano ET AL., 2001]. A enzima bifuncional é regulada por fosforilação (Figura 10.3)

Figura 10.3 - Regulação da enzima bifuncional PFK-2/FBPase-2 por fosforilação defosforilação. 1- quinase e 2- fosfatase

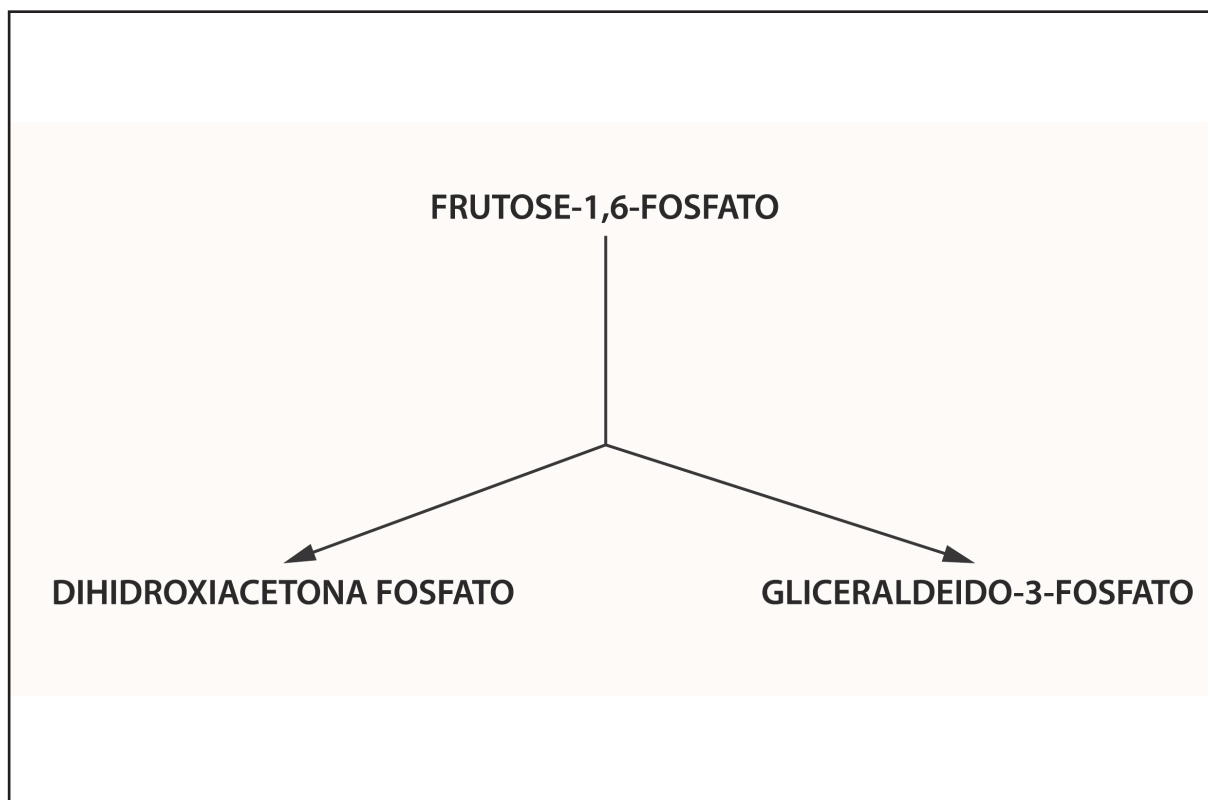


A fosforilação se dá pela catálise da proteína quinase, inativando a atividade quinase da PFK-2a/ FBPase-2b, porém ativando a atividade fosfatase. A desfosforilação pela proteína fosfatase remove o grupo fosforila da enzima bifuncional para ativar a atividade quinase e inativar a atividade fosfatase. Desse modo a concentração de fru-2,6-BF é regulada por um mecanismo de modificação covalente. A relação das atividades quinase/fosfatase de uma determinada isoenzima num tecido responde pelo efeito na concentração da frutose-2,6-bisfosfato. Isoenzimas codificadas pelos genes PFKFB-1, PFKFB-2 e PFKFB-4 foram originalmente descritos nas células do fígado, músculo, coração e testículo revelando que apresentam relação quinase/fosfatase iguais [Okar, Lange 1999]. No entanto essa relação pode ser alterada substancialmente em resposta a vários estímulos [Hue, Beauloye et al., 2002; Wang, Donthi et al., 2008]. Outra isoenzima da família a PFKFB-3 foi identificada por ser ativada por estímulos mitogênicos, inflamatórios e hipóxicos, por revelar marcante aumento da atividade quinase e reduzida atividade bisfosfatase [Sakibara, Kato et al., 1997; Chesney, Mitchell et al., 1999; Atsumi, Chesney et al., 2002; Minchenko, Leshchinsky et al., 2002].

Regulação Hormonal: Outro tipo de regulação da enzima PFK-2 é a regulação hormonal. A atividade da PFK-2 aumenta em resposta a sinalização de insulina, elevando os níveis de frutose-2,6-bisfosfato, resultando na intensificação da taxa glicolítica [Pilkis, Crisman et al., 1983; Rider, Bertrand et al., 2004; Atsumi, Nishio et al., 2005]. Por outro lado, quando a concentração de glicose do sangue aumenta, o glucagon produzido pelas células alfa do pâncreas é liberado e circula no sangue até encontrar o receptor hepático que lhe é específico, sinalizando para reduzir a glicólise. A ação de glucagon em reduzir a concentração da frutose-2,6-bisfosfato, tem sido relatado ser através da proteína quinase dependente de cAMP [Pilkis, El-Maghrabi et al., 1982; El-Maghrabi, Claus et al., 1982]. A ligação do glucagon ao seu receptor na superfície da membrana plasmática das células hepáticas ativa a proteína G acoplado ao receptor. A proteína G estimuladora vai estimular a enzima adenil ciclase (AC), que por sua vez atua sobre o ATP produzindo o cAMP. Este liga a subunidade reguladora da proteína quinase (R) liberando a subunidade catalítica (C). A subunidade catalítica fosforila a PFK-2 inativando a atividade quinase e ativando a atividade bifosfatase. Com isso, a concentração da frutose-2,6-bisfosfato, um efetor alostérico positivo da PFK-1 é reduzida, restringindo o fluxo glicolítico da reação que converte a frutose-6-fosfato para frutose-2,6-bisfosfato.

3. Formação de Trioses-fosfatos

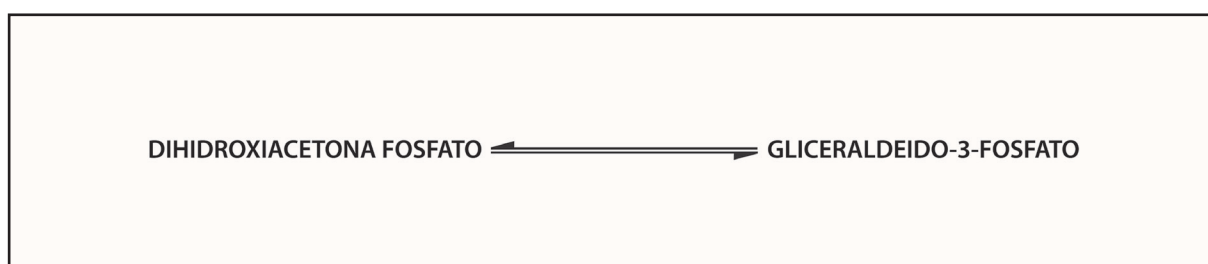
As trioses fosfatos (dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) são formados a partir da cisão da frutose-1,6-bisfosfato, numa reação catalisada pela enzima frutose-1,6-bisfosfato aldolase. A aldolase é uma enzima pertencente a classe das liases, que catalisam reações de cisão de ligações carbono-carbono, mas que podem também, cindir ligações carbono-nitrogênio. A frutose-1,6-bisfosfato aldolase cindi a frutose-1,6-bisfosfato em duas trioses, a DHAP e a G-3-P. Esta é uma reação reversível, correspondente a uma cisão aldólica num sentido e condensação aldólica no sentido oposto (Figura 10.4).

Figura 10.4 - Reação catalisada pela frutose-1,6-bisfosfato aldolase

Em mamíferos são descritos três tipos de isoenzimas da aldolase, os tipos A, B e C com diferentes distribuições teciduais e cinética. A aldolase A, encontrada no músculo e glóbulos vermelhos, a aldolase B encontrada no fígado, rins e intestino delgado e a aldolase C, presente no cérebro e tecido neural. Um aspecto que chama a atenção sobre a aldolase é a sua certa resistência a agentes desnaturantes, mantendo sua atividade catalítica. A aldolase do músculo de coelho contém 28 grupos sulfidrilas (-SH) por molécula, dos quais, no estado nativo de 4-6 destes grupos são detectados por reagentes para sulfidrilas. Porém, quando tratado com palmitoil sarcosinato de sódio, grupos sulfidrilas adicionais são expostos. No entanto, a enzima só começa a perder sua atividade catalítica após serem expostos 14 dos 28 grupos sulfidrilas indicando, que o sítio catalítico da enzima retém sua conformação para a atividade catalítica [Nicolau, Bacila 1969].

4. Reação da Triose fosfato Isomerase

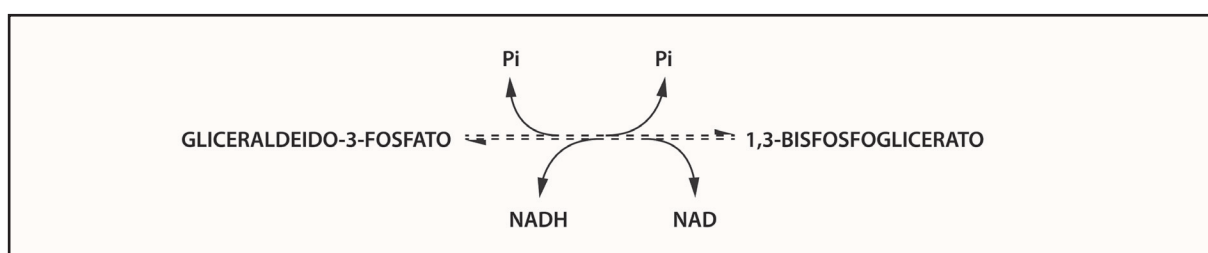
A enzima triose-fosfato isomerase, pertencentes a classe das isomerases catalisa a interconversão reversível entre DHAP para G-3-P, logo uma molécula de glicose que é utilizada fornece 2 moléculas de G-3-P, para seguir a via glicolítica.



Com a transformação da dihidroxiacetona fosfato para gliceraldeído-3-fosfato, uma molécula de glicose, com 6 átomos de carbono fornece 2 moléculas de gliceraldeído-3-fosfato com 3 átomos de carbono.

5. Reação Catalisada pela Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima chave da via glicolítica, catalisando a oxidação de um aldeído (gliceraldeído-3-fosfato) a um ácido carboxílico (1,3-bisfosfo glicerato), com redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo NAD^+ para NADH. O ácido produzido o 1,3-bisfosfoglicerato possui grande energia livre negativa, o que possibilita sua participação na reação seguinte da via glicolítica [Bruns, Gerald 1976; Sirover 1999].

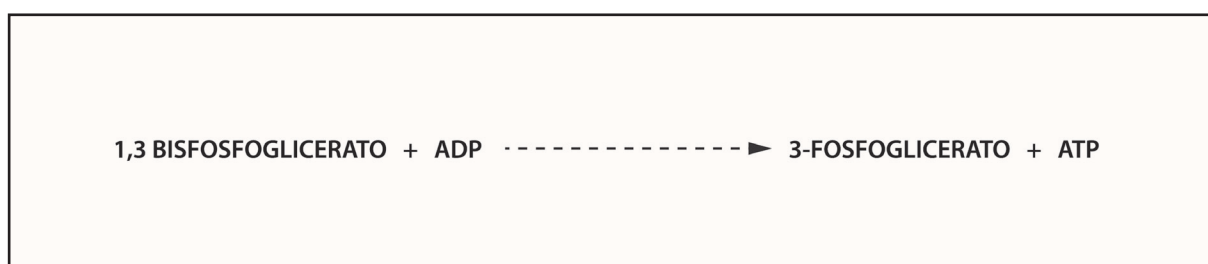


A reação é livremente reversível na célula.

As propriedades funcionais da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase são reguladas, pelo menos em parte, por sua oligomerização, modificação pós-tradução e localização subcelular. As modificações pós-tradução podem ser reversíveis e irreversíveis [Tristan, Shahani et al., 2011]. No citoplasma celular a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é encontrada na isoforma tetramérica, tendo em cada subunidade um grupo sulfidril catalítico [Tristan, Shahani et al., 2011]. O estresse oxidativo induz a tiolação de grupos sulfidrilas reativas da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, provavelmente um mecanismo de proteção à enzima glicolítica de inativação oxidativa irreversível [Schuppe-Koistnen, Moldeus et al., 1994; Grant, Quin, Dawes 1999]. O que é tiolação? Tiolação nada mais é do que a modificação de grupo sulfidril (-SH) reativo, pela formação de dissulfetos com moléculas de baixo peso molecular, como por exemplo A glutathiona. Essa modificação é metabolicamente lábil [Thomas, Poland, Hozatko 1995]. A quantidade de NAD^+ no citossol é limitada, de modo, que a continuidade da via glicolítica vai depender da oxidação de NADH para NAD^+ .

6. Reação Catalisada pela Fosfoglicerato Quinase

A fosfoglicerato quinase (PGK) é uma enzima que catalisa a sétima etapa da glicólise e a primeira a produzir energia na forma de ATP na via glicolítica. O ATP é produzido a partir de um composto de alta energia a 1,3-bisfosfoglicerato.



Como uma molécula de glicose fornece duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato, nessa etapa, há a formação de duas moléculas de ATP. O ATP formado dessa maneira é conhecida como fosforilação a nível de substrato, isto porque o doador a 1,3-bisfosfoglicerato é um substrato de alto potencial de transferência de grupo fosforila.

Em humanos, existem duas isoenzimas de fosfoglicerato quinase codificados por diferentes genes, a fosfoglicerato quinase-1 (PGK-1) e a fosfoglicerato quinase-2 (PGK-2) [McCarrey, Thomas 1987; Willard, Goss et al., 1985]. A enzima é composta por dois domínios de aproximadamente mesmo tamanho, o domínio N-terminal e o domínio C-terminal, separados por uma fenda ligadas por duas alfas hélices [Blake, Rice 1981]. O domínio N-terminal tem sítios de ligação para 3-fosfoglicerato e 1,3-bisfosfoglicerato, enquanto o domínio C-terminal apresenta sítio de ligação para nucleotídeo [Banks, Blake et al., 1979; Watson, Walker et al., 1982; Zheng, Filippova et al., 2012].

7. Reação Catalisada pela Fosfoglicerato Mutase

A oitava reação da via glicolítica é catalisada pela fosfoglicerato mutase. Mutase é uma enzima que catalisa a mudança intramolecular de um grupo químico, como por exemplo, o grupo fosforila, de uma posição num carbono para outra posição em outro carbono da mesma molécula. Contudo, o mecanismo da reação catalisada pela fosfoglicerato mutase não é simplesmente a mudança de um lugar para outro. Essa enzima possui em seu sítio ativo um resíduo do amino ácido histidina, importante para que a reação ocorra. Primeiro a enzima é fosforilada no resíduo de histidina e requer quantidades catalíticas de 2,3 bisfosfoglicerato para manter o resíduo de histidina na forma fosforilada.

Em humanos a fosfoglicerato mutase é uma proteína dimérica com duas subunidades diferentes, a cerebral (PGAM-1) e a muscular (PGAM-2) [Sharif, Rasul et al., 2019]. Três isoenzimas da fosfoglicerato mutase são encontrados em mamíferos adultos, presentes como homo e heterodiméricos. A isoenzima do músculo (M) e a do cérebro (B) são homodiméricas, enquanto a heterodimérica é encontrada no coração [Tsujino, Shanske et al., 1993; Ren, Wu et al., 2010; Sharif, Rasul et al., 2019]. A enzima bisfosfoglicerato mutase é uma enzima multifuncional [Aljahdali, Musayev et al., 2022], atuando como sintase de 2,3-bisfosfoglicerato e como uma fosfatase de 2,3-bisfosfoglicerato e como fosfoglicerato mutase. Seu sítio catalítico é o responsável pelas três funções exercidas pela enzima, sendo, no entanto, a atividade sintase a principal. Ela catalisa a isomerização de 1,3-bisfosfoglicerato para 2,3-bisfosfoglicerato, que é um efetor alostérico da hemoglobina [Rose, Whalen 1973; Rose, Dube 1976]. Já a atividade fosfatase é a responsável pela hidrólise de 2,3 bisfosfoglicerato para 3-fosfoglicerato, um intermediário da via glicolítica.

8. Reação catalisada pela enolase

A nona etapa da via glicolítica é a reação catalisada pela enzima enolase (2-fosfo-D-hidrolase), uma metaloenzima que converte o 2-fosfoglicerato num composto com uma dupla ligação na molécula, o fosfoenolpiruvato, o qual apresenta um grupo fosforila de alta energia. A reação de remoção de água do 2-fosfoglicerato é a que dá continuidade à glicólise, portanto é uma reação catabólica, por outro lado, a reação reversa, a hidratação do fosfoenolpiruvato para formar o 2-fosfoglicerato é uma reação anabólica, que ocorre durante a gliconeogênese. Ambas as reações são catalisadas pela mesma enzima.



Em vertebrados são encontrados três isoenzimas: a alfa enolase encontrada numa variedade de tecidos incluindo o fígado; a beta enolase encontrada quase que exclusivamente no músculo e a gama enolase encontrada nos neurônios e tecidos neuroendócrinos [Marangos, Zisa et al., 1978]. A enolase requer para sua atividade certos íons metálicos divalentes. O magnésio (Mg^{2+}) é o cofator natural, na presença do qual a enzima apresenta sua mais alta atividade, sendo por isso classificada entre as enzimas chamadas metaloenzimas [Pancholi 2001]. Embora sendo o efetor natural da enolase, o magnésio tem uma ligação com a enzima mais fraca do que aquela do zinco com a enzima [Brewer, Ellis 1983; Brewer 1985]. O papel do magnésio, na atividade da enolase é duplo, uma vez que dois tipos de sítios de ligações contribuem para a reação química se realizar [Faller, Baroudy et al., 1977]. O primeiro sítio é chamado conformacional. Ele induz alterações conformacionais no sítio ativo e permite a ligação do substrato e seus análogos. Uma vez ligado, o segundo íon magnésio se liga ao segundo sítio e serve como o componente requerido para a atividade da enzima. A enolase realiza múltiplas funções bioquímicas. A enolase quando catalisa a conversão do 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato, desempenha uma função importante em vários processos fisiológicos [Kang, Jung et al., 2008].

9. Reação catalisada pela piruvato quinase

Vimos no tópico anterior, que a reação catalisada pela enolase forma um composto, o fosfoenolpiruvato, que apresenta marcante potencial para a transferência de grupo fosfato. A piruvato quinase, catalisa a transferência do grupo fosfato para o ADP produzindo o ATP e piruvato. Essa reação é energeticamente favorável, em virtude da alta energia livre de hidrólise que o fosfoenolpiruvato apresenta [Mazurek, Grimm et al., 2002]. Durante a catálise o sítio ativo da enzima é ocupado pelos dois substratos, o fosfoenolpiruvato e o complexo ADP-Mg, um cátion monovalente e outro divalente [Gupta, Oesterling 1976].



A piruvato quinase é uma enzima tetramérica de subunidades idênticas, arranjadas numa configuração dímero-dímero. Cada monômero contém um sítio ativo, formado por três domínios designados A, B e C [Stammer, Muirhead 1977; Muirhead, Clayden et al., 1986]. O sítio ativo situa-se numa fenda entre os domínios A e B. O domínio B é móvel e após ligar o Mg-ADP ele se fecha no sítio ativo [Larsen, Benning et al., 1998]. A piruvato quinase é mais ativa como tetrâmero. Para a sua atividade a piruvato quinase requer um cátion monovalente e outro divalente (Mg^{2+} ou Mn^{2+}), importante na formação do complexo com o ADP [Baek, Nowak 1983]. Existem 4 isoformas de piruvato quinase em mamíferos, a saber PKM1, PKM2, PKML e PKMR. Muito embora um tecido possa expressar mais do que uma forma de piruvato quinase, geralmente células individuais expressam apenas uma isoforma em níveis apreciáveis. A maioria dos tecidos

adultos expressa a isoforma PKM2 [Cardenas, Dyson 1978; Immaura, Tanaka 1972; Israelsen, Vander Heiden 2015]. A isoforma PKM1 é encontrada em tecidos com alta demanda catabólica, como o músculo esquelético, coração e cérebro. A tabela 10.1 esquematiza as etapas da glicólise.

Tabela 10.1 - As dez etapas da via glicolítica

Etapa	Reagentes	Produtos
1	GLICOSE+ATP	GLICOSE-6-FOSFATO
2	GLICOSE-6-FOSFATO	FRUTOSE-6-FOSFATO
3	FRUTOSE-6-FOSFATO+ATP	FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO
4	FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO	DIHIDROXIACETONA FOSFATO+GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO
5	DIHIDROXIACETONAFOSFATO	GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO
6	GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO+Pi+NAD	1,3-BISFOSFOGLICERATO
7	1,3-BISFOSFOGLICERATO+ADP	3-FOSFOGLICERATO + ATP
8	3-FOSFOGLICERATO	2-FOSFOGLICERATO
9	2-FOSFOGLICERATO	FOSFOENOLPIRUVATO
10	FOSFOENOLPIRUVATO+ADP	PIRUVATO + ADP

METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

O glicogênio é um polissacarídeo. Polissacarídeos são oligossacarídeos formados pela ligação de múltiplos monossacarídeos. Quando o polissacarídeo é composto pelo mesmo monossacarídeo, ele recebe o nome de homopolissacarídeo, caso do glicogênio constituído por unidades de glicose. Quando o polissacarídeo é constituído por unidades formadas por monossacarídeos diferentes, recebe o nome de heteropolissacarídeo, caso do ácido hialurônico formado por ácido glicurônico e acetil glicosamina. O glicogênio é um polissacarídeo formado por unidades de glicose, apresentando uma cadeia linear com ramificações, e que serve de reserva de energia para ser utilizado em períodos de necessidade. Encontrado em praticamente todas as células do organismo, mas principalmente nas células musculares e hepáticas, por diferentes razões. Enquanto, o músculo armazena o glicogênio reservado para rápida produção de ATP para as suas necessidades, no fígado o glicogênio representa uma reserva prontamente mobilizável para a manutenção dos níveis sanguíneos de glicose.

Estrutura do Glicogênio

A polimerização do glicogênio se inicia pela formação de ligações glicosídica α -1,4 entre os resíduos de glicose. A ligação glicosídica é aquela que ocorre entre o carbono anomérico

(carbono-1) de uma unidade de glicose com um grupo alcoólico. A formação de cadeias longas de glicose no glicogênio, resulta em acúmulo patológico, como é o caso das doenças de Lafora e Anderson [Sullivan, Nitschke et al., 2019], onde o glicogênio forma duplas hélices insolúveis, que precipitam e são incapazes de liberar a glicose armazenada [Sullivan MA, Nitschke 2017]. A síntese de glicogênio, pela enzima glicogênio sintase e ramificações realizadas pela enzima glicogênio ramificadora, produz macromoléculas de glicose contendo cerca de 5.000 unidades de glicose, que são conhecidas como partículas beta de glicogênio [Sullivan, Forbes 2019].

A estrutura metabólica do glicogênio relaciona-se a função do tecido onde está presente. As partículas alfas, presentes no fígado e no coração são degradados mais lentamente, fornecendo uma liberação de glicose mais estável e sustentada [Jiang, Zhang et al., 2016]. Ao contrário, o predomínio das partículas beta menores no músculo esquelético, permite uma rápida liberação da glicose para o fornecimento de energia para as contrações das fibras, que permite o movimento [Jiang, Zhang et al., 2016]. Muito embora, a composição do glicogênio seja predominantemente de glicose, são descritos a presença de outros constituintes como é o caso de glicosamina [Kirkman, Whelan, Bailey 1989; Kirkman, Whelan 1986]. Também foi descrito a presença do grupo fosfato no glicogênio [Lomako, Lomako et al., 1994; Lomako, Lomako et al., 1993].

A fosforilação excessiva do glicogênio está associada a uma forma de epilepsia chamada doença de Lafora [Andrade, Turnbull, Minassian 2007; Delgado-Escueta 2007]. Várias proteínas podem se associar a partículas de glicogênio, como a glicogenina, a glicogênio sintase, a glicogênio fosforilase, glicogênio desramificante [Graham 2009; Stapleton, Nelson et al., 2010]. Os grânulos de glicogênio são abundantes no fígado de animais bem alimentados, porém em jejum de 24 horas, não são mais encontrados indicando sua utilização. Por outro lado, intensos exercícios causam perda da reserva de glicogênio muscular.

GLICOGÊNESE

1. CAPTAÇÃO DA GLICOSE: Para que a glicose possa ser aproveitada pelo organismo, precisa primeiro entrar na célula. De modo geral, as células possuem um transportador específico para tal o GLUT. No cérebro a captação de glicose ocorre transportado pelo GLUT-1, através do endotélio da barreira sangue-cérebro. O cérebro é o órgão responsável pela maioria da glicose captada por todo o corpo durante o período pós-absortivo [Gottesman, Mandarino, Gerich 1983]. No músculo esquelético o transporte de glicose ocorre pelos transportadores GLUT-1 e GLUT-4. O GLUT-1 é um transportador de membrana plasmática, enquanto o GLUT-4 está em vesícula e após estimulação ele se desloca para a membrana plasmática [Lauritzen, Schertzer 2010]. Por outro lado, para as células hepáticas e alfa e beta pancreáticas o transportador é o GLUT-2, um transportador que permite a entrada de glicose através de um gradiente de concentração entre sangue e tecido.

2. FOSFORILAÇÃO DA GLICOSE: A fosforilação da glicose, visto anteriormente, é catalisada pela hexoquinase formando glicose-6-fosfato. Como já vimos existem quatro isoenzimas de hexoquinase, a I, II, III e a IV (esta última conhecida como glicoquinase):

O músculo esquelético expressa a isoenzima II enquanto, que o fígado e as células alfa e beta pancreáticas expressam a hexoquinase IV (glicoquinase) [Bedoya, Wilson et al., 1986].

No estado de jejum a utilização da glicose é limitada, devido a inibição da enzima pela proteína reguladora da glicoquinase. No período pós-prandial a glicoquinase é inativa, o que interfere no metabolismo celular pancreático e hepático [Raimondo, Rees, Gloyne 2015].

Isomerização da Glicose-6-Fosfato: A glicose-6-fosfato formada sofre isomerização para

glicose-1-fosfato, numa reação catalisada pela enzima fosfoglicomutase.

Em humanos são descritos 5 isoenzimas de fosfoglicomutase (PGM-1, 2, 3, 4 e 5). A PGM-1 é uma fosfotransferase, isto é, transfere o grupo fosforila do carbono 6 para o carbono 1 da glicose, e na reação ele requer um íon divalente para sua atividade, principalmente o Mg^{2+} . O PGM-3, também conhecido como N-acetilglicosamina fosfomutase (AGM-1) catalisa a conversão reversível entre N-acetilglicosamina-6-fosfato e N-acetilglicosamina-1-fosfato. Este composto é um requisito para a biossíntese de UDP-N-acetil glicosamina, um precursor essencial para a glicosilação de proteínas [Pang, Koda et al., 2002].

3. FORMAÇÃO DE UDPG-GLICOSE: A formação da uridinadifosfato-glicose é uma etapa importante para a síntese de glicogênio. A UDP-glicose é formada a partir da reação entre a glicose-1-fosfato e a uridinatrifosfato (UTP) numa reação catalisada pela enzima UDP-glicose pirofosforilase. O doador de glicose para a biossíntese de glicogênio, a UDP-glicose é uma forma ativada da glicose, isto porque o grupo hidroxila do carbono 1 da glicose está esterificado ao difosfato do UDP. A UDP-glicose é sintetizada pela reação que se processa entre a glicose-1-fosfato (G-1-P) e a uridina trifosfato (UTP), catalisada pela enzima UDP-glicose fosforilase. É uma reação reversível, porém, o pirofosfato formado é rapidamente hidrolisado numa reação irreversível, o que proporciona a força guiadora para a síntese de UDP-glicose. Uma das formas de regulação desta enzima é a oligomerização. Várias enzimas têm nas formas monoméricas sua atividade, enquanto as formas diméricas são inativas.

4. SÍNTESE DE NOVO DO GLICOGÊNIO. GLICOGENINA: Um aspecto intrigante sobre a síntese do glicogênio residia no fato de não haver informações sobre como ela se iniciava. Esse aspecto foi praticamente esclarecido, quando foi verificado que era uma proteína, a iniciadora da formação do glicogênio, a glicogenina. A glicogenina é uma proteína, de peso molecular de 38 KDa, isolada pela primeira vez do glicogênio do músculo de coelho [Rodriguez, Whelan 1985], ligada covalentemente ao glicogênio através do amino ácido tirosina. Posteriormente, a glicogenina foi purificada de glicogênio muscular [Pitcher, Smythe et al., 1987]. A glicogenina é uma proteína homodimérica, constituída por 332 resíduos de amino ácidos, com um sítio de ligação a glicose, no resíduo de tirosina e que atua como autoglicosil-transferase [Pitcher, Smythe, Cohen 1988]. A glicogenina é responsável pela síntese de novo do glicogênio, que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, o resíduo de tirosina de uma subunidade (Tyr 194) do músculo de coelho [Smythe, Caudwell et al., 1988; Cao, Mahrenholz et al., 1993], é glicosilado pelo seu parceiro numa reação intersubunidades [Pitcher, Smythe, Cohen 1988; Lin, Mu et al., 1999]. Na segunda etapa outros resíduos glicosilas são adicionados sucessivamente numa reação inter subunidades [Cao, Mahrenholz et al., 1993].

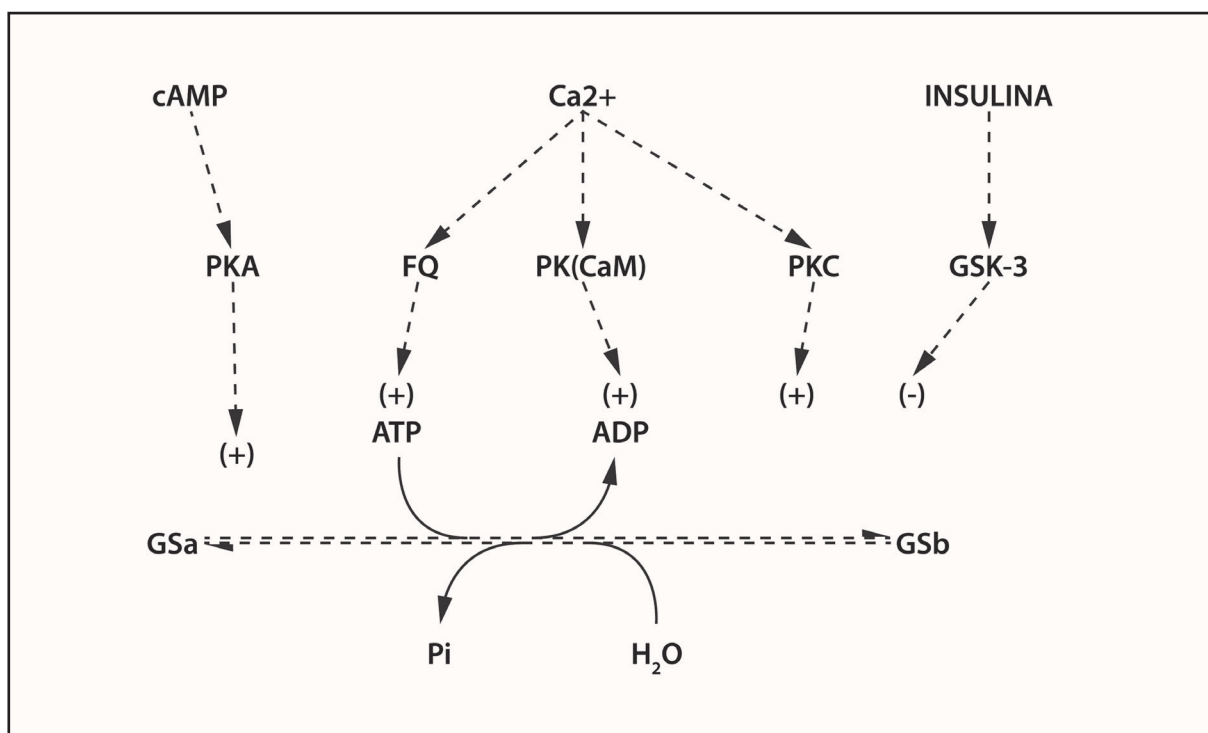
O recrutamento da enzima glicogênio sintase pela extremidade C-terminal da glicogenina permite que a cadeia linear formada pela glicogenina seja alongada com novas formações de ligações glicosídica a 1,4 [Zeqiraj, Sicheri 2015; Skurat, Dietrich, Roach 2006]. Duas isoformas de glicogenina são descritas para os seres humanos: glicogenina-1 e glicogenina-2. A glicogenina-1 é expressa predominantemente no músculo esquelético e coração, porém, também é expresso em menor extensão no pulmão, rins, cérebro e pâncreas, mas não no fígado [Barbetti, Rocchi et al., 1996]. A glicogenina-2 é expressa primariamente no fígado [Mu, Roach 1998; Curtino, Aon 2019].

5. ALONGAMENTO DA CADEIA OLIGOSSACARÍDICA: A glicogênio sintase é uma enzima incapaz de realizar síntese de novo. Ela só atua tendo um substrato adequado, como é o caso da cadeia de glicose formada pela glicogenina. Ela só começa a atuar após recrutamento pela porção C-terminal da glicogenina, criando novas ligações glicosídicas α -1,4. A glicogênio sintase responde pela transferência do grupo glicosila ativado do UDP-glicose, para o carbono 4

do resíduo de glicose do glicogênio em crescimento. A porção terminal da cadeia de glicogênio, que recebe o novo resíduo é referido como terminal não redutor. A glicogênio sintase é um dos membros da superfamília de glicosiltransferases (GT-B) [Bourne, Henrissat 2001].

Em mamíferos dois genes codificam a glicogênio sintase: a glicogênio sintase-1 (GYS-1), que é expressa no músculo esquelético e em outros tecidos com capacidade de sintetizar o glicogênio, e a glicogênio sintase-2 (GYS-2) encontrada no fígado, pâncreas e coração [Browner, Nakano et al., 1989; Nuttal, Ganon et al., 1994; Curtino, Aon 2019]. A glicogênio sintase de mamíferos foi um dos primeiros exemplos de uma enzima multifosforilada [Smith, Brown, Lamer 1971]. A glicogênio sintase existe sob duas formas: a forma D fosforilada dependente da presença de glicose-6-fosfato para sua atividade e a forma I não fosforilada independente da glicose-6-fosfato para sua atividade. A forma D é também conhecida como forma b inativa, enquanto a forma I é conhecida como forma a ativa. A fosforilação da enzima glicogênio sintase é catalisada por várias proteínas quinases [Roach, DePaoli-Roach et al., 2012], enquanto a desfosforilação é catalisada pela proteína fosfatase-1 e 2A [Alemany, Tung et al., 1984](Figura 10.5).

Figura 10.5 - Regulação da atividade da glicogênio sintase por ligação covalente



A fosforilação da glicogênio-sintase, é catalisada por proteínas quinases, que são regulados por segundos mensageiros ou ação de hormônios. O cAMP ativa a proteína quinase A (PKA), para fosforilar a glicogênio sintase. O Ca^{2+} por sua vez influencia o estado de fosforilação atuando sobre a fosforilase quinase (FQ), proteína quinase dependente de calmodulina (PK-CaM) e proteína quinase C (PKC). A glicogênio sintase é também, fosforilada pela glicogênio-sintase quinase-3 (GSK-3), que não está sujeito a regulação nem pelo cAMP nem pelo Ca^{2+} , porém está sujeito a regulação pela insulina, através da proteína quinase B (PKB) que inativa a enzima. Trabalhos sobre a fosforilação da glicogênio-sintase leva ao conceito de fosforilação hierarquizada, através do qual a introdução de um grupo fosfato habilita a adição do segundo [Roach 1990; Roach 1991].

6. RAMIFICAÇÃO DO GLICOGÊNIO: O glicogênio é um polímero que apresenta ramificações, resultado das ações de três enzimas: primeiro a glicogenina, responsável pela síntese de novo, que produz um substrato básico; segundo a enzima glicogênio sintase atua no substrato

básico alongando-o pela formação de ligações glicosídicas α -1,4 e terceiro, as ramificações são realizadas pela enzima glicogênio ramificadora com a formação de ligações glicosídicas α -1,6. Neste ponto poderíamos perguntar, por que o glicogênio é ramificado e não simplesmente linear? O fato da molécula possuir inúmeros terminais não redutores, possibilita que a glicogênio fosforilase possa ter vários sítios de ataque, quando for o momento de sua mobilização, e também ter vários sítios para a adição de novas unidades de glicosila pela glicogênio sintase. Se a molécula fosse tão somente linear, sua degradação seria lenta por possuir apenas um terminal não redutor. Enzimas glicogênio ramificadoras, GBEs (*Glycogen Branching Enzyme*), são proteínas de larga distribuição envolvidas na síntese de glicogênio [Suzuki, Suzuki 2016]. Enzimas GBEs respondem pela formação de novas ligações glicosídicas α -1,6 no glicogênio [Jo, Park et al., 2015; Gaenssle, Bax et al., 2021]. A enzima ramificadora corta um bloco de resíduo contendo 7 unidades e o transfere a um sítio mais interior. O bloco de resíduos deve ter uma terminação não redutora, proveniente de uma terminação de pelo menos 11 resíduos de comprimento. Além disso, o novo ponto de ramificação deve estar a pelo menos 4 resíduos longe de uma já pré-existente. A ramificação é importante por aumentar a solubilidade do glicogênio facilitando sua mobilização.

GLICOGENÓLISE

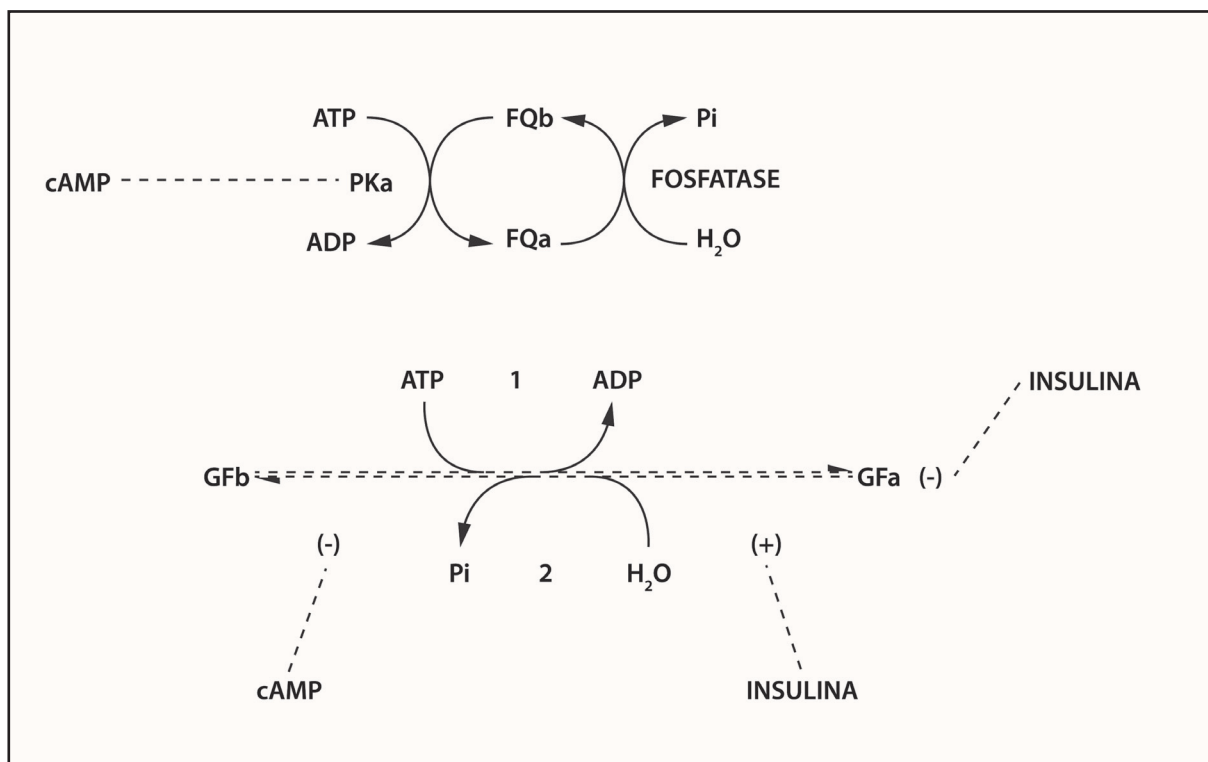
O termo glicogenólise refere-se ao processo de mobilização do glicogênio para fornecer a glicose ou a glicose-6-fosfato. É um processo que ocorre em todos os tecidos contendo glicogênio, mas principalmente no fígado e músculo. Em humanos bem nutridos, o teor de glicogênio no fígado responde por cerca de 10% do peso húmido do órgão, enquanto, que no músculo, de 1-2% do peso húmido do tecido. Considerando, que um indivíduo tem uma quantidade de músculo muito maior que o fígado, então chega-se à conclusão, que em valor absoluto a quantidade de glicogênio do músculo é bem maior que o do fígado. Alterações no armazenamento do polissacarídeo durante o ciclo diurno, refletem as alterações nas atividades das enzimas responsáveis pela síntese e degradação do glicogênio [Udoh, Swain, Filiano 2015]. O processo em que a glicogênio fosforilase (GF) cliva o glicogênio requer a presença de fosfato (HPO_4^{2-}) sendo referido como fosforólise.



Portanto, a GF (1,4 α -D-glucan: ortofosfato glicosil transferase) é uma enzima que catalisa a clivagem fosforolítica reversível de ligações glicosídicas α -1,4 das terminações não redutoras das cadeias laterais do glicogênio, resultando na formação da glicose-6-fosfato. A glicose-1-fosfato (G-1-P) formado nessa reação é rapidamente convertida a glicose-6-fosfato (G-6-P), um importante intermediário metabólico, pela enzima fosfoglicomutase. In vitro, a reação catalisada pela GF é rapidamente reversível. São descritos 3 isoformas de glicogênio fosforilase (GF) codificados por 3 genes: PYGL, expressa no fígado; PYGM, expressa no músculo e PYGB expressa no cérebro. A identidade na sequência de aminoácidos das 3 isoformas é alto, cerca de 80% [Hudson, Hefferon, Crerar 1993; Hudson, Golding, Crerar 1993; Newgard, Hwang, Fletterick 1989]. A GF é um dímero, com duas faces: uma face com acesso ao sítio catalítico, que estaria em contato com o glicogênio e outra face, reguladora contendo a extremidade N-terminal e o sítio ativado pelo AMP, expostos no citoplasma. O fosfato de pridoxal é um fator essencial para a atividade da enzima. Todas as 3 isoenzimas são reguladas alostericamente por ligações a vários efetores metabólicos e por fosforilação reversível da serina-14 [Newgard, Hwang, Fletterick et al., 1989]. A GF existe sob duas formas conformacionais, uma forma dita relaxada ou estado R, ativa e outra tensa ou

estado T, inativa. A forma R apresenta alta afinidade ao substrato e certos efetores alostéricos como AMP, enquanto a forma T apresenta baixa afinidade ao substrato [Johnson 1992]. A forma R ativa é conhecida como glicogênio fosforilase a (GFa) e é fosforilada, enquanto a forma T inativa desfosforilada é conhecida como glicogênio fosforilase b (GFb) [Fletterick, Madsen 1980; Johnson 1992]. A fosforilação da serina-14 é catalisada pela enzima fosforilase quinase (FQ), um hexa decâmero de 4 subunidades: $\alpha 4$, $\beta 4$, $\gamma 4$ e $\delta 4$. As subunidades α e β medeiam a ativação da FQ, pela fosforilação da proteína quinase dependente de cAMP, a subunidade γ é a unidade catalítica e a subunidade δ é a calmodulina (CaM) [Agius 2010.2]15]. A interconversão entre a GFa ativa e a GFb inativa é independente da atividade da fosforilase quinase (FQ) e fosforilase fosfatase (FF) (Figura 10.2). A GFa é inibida pela glicose e vários ligantes do sítio alostérico, como cafeína, riboflavina e ácido úrico, sendo essa inibição neutralizada pelo AMP [Kasvinsky, Shechosky, Fletterick 1978; Kasvinsky, Fletterick, Madsen 1981].

Figura 10.6 - Regulação de glicogênio fosforilase (GF) por modificação covalente e efetores alostéricos. 1-fosforilase e 2-fosfatase



A fosforilase hepática é também inibida pela glicose-6-fosfato (G-6-P), competitivamente com AMP. A conversão da GFa a GFb por desfosforilação do resíduo serina-14 é catalisada pela proteína fosfatase-1 em conjunto com a proteína que tem como alvo o glicogênio, PTG (*Protein Targeting to Glycogen*) (subunidade G) da família de PPP-1RC [Ceulemans, Stalmans, Bollen 2002].

Considerações sobre Fosforilação: A fosforilação reversível de proteínas é caracterizada pela adição de grupo fosfato (Pi) doado pelo ATP e catalisada pela proteína quinase, enquanto, que a sua remoção de proteínas fosforiladas é uma reação catalisada pela proteína fosfatase. O processo de fosforilação regula as funções das proteínas por modulação das interações proteína-proteína, alterando sua conformação. O grupo fosfato (HPO_4^{2-}) é di-iônico no pH fisiológico. Presente na cadeia proteica, o grupo fosforila pode interagir com resíduos de amino ácidos vizinhos, formando pontes de hidrogênio e pontes salinas. Uma das formas mais comuns de interação é o dipolo α -hélice da cadeia principal, contendo nitrogênio no C-terminal, com a finalidade

de neutralizar o efeito combinado de dipolo carbonílico [Johnson, Lewis 2001]. Outro modo comum de interação é a formação de pontes de hidrogênio e pontes salinas entre o oxigênio do fosfato com a arginina ou lisina de cadeias laterais [Mandell, Chorny et al., 2007; Nishi, Shaytan, Panchenko 2014].

GLICOFAGIA

A autofagia é um processo celular de autodigestão, envolvendo a degradação de macromoléculas, malformadas, organelas lesadas como uma forma de reciclagem homeostática. Pesquisas confirmam a autofagia como um processo de captura de cargas específicas engolfadas, que tem um papel mais seletivo em respostas a vários indícios fisiológicos [Johansen, Lamark 2011]. O mecanismo molecular da autofagia envolve a marcação do material a ser degradado por um receptor autofágico e sua captura numa estrutura de dupla membrana, o autofagossomo, pela ligação a uma proteína relacionada a família de proteínas de autofagia 8, ATG-8 (*Autophagy Related Protein-8*), que está ancorado na membrana. Ocorrida a fusão do autofagossomo com o lisossomo, enzimas ativadas por ácidos degradam o conteúdo do autofagossomo [Koutsifeli, Varma et al., 2022]. O termo glicofagia refere-se a uma autofagia seletiva e específica para o glicogênio, em que o polissacarídeo é degradado dentro do lisossomo. O processo é importante em alguns tecidos para a manutenção da homeostase da glicose em condições de demanda para o fornecimento do monossacarídeo, como coração, fígado e outros órgãos, principalmente em recém nascidos [Kondomerkos, Kalimidas, Kotoulas 2004].

O glicogênio constitui um meio efetivo de armazenamento de energia em ambos, citoplasma e vacúolos autofágicos, diferentes entre si. Enquanto, no citoplasma, ocorre a ativação da enzima glicogênio fosforilase, que catalisa o processo fosforolítico do glicogênio produzindo a glicose-1-fosfato, nos vacúolos autofágicos o glicogênio é hidrolisado produzindo a glicose livre, isto porque os lisossomos autofágicos, contém a enzima alfa-glicosidase ácida ativa.

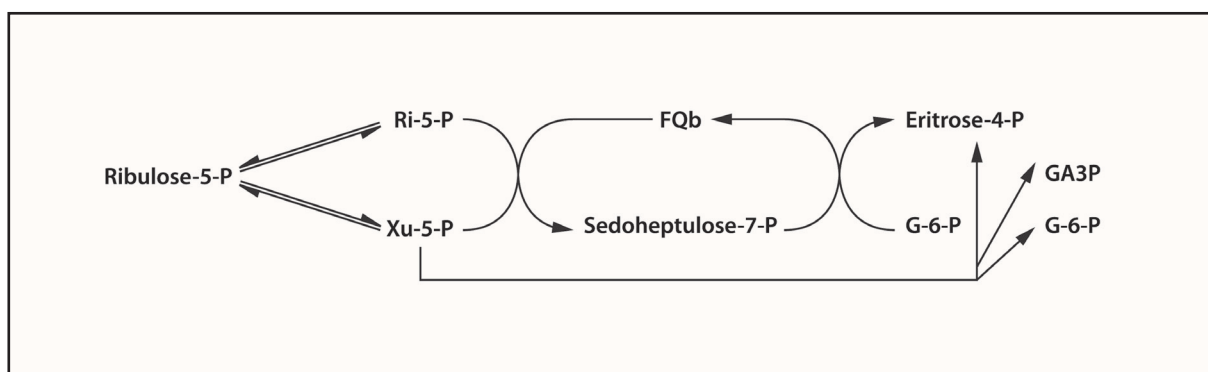
A glicofagia é induzida pela via de sinalização do cAMP/proteína quinase A (PKA). O cAMP aumenta a formação de vesículas autofágicas e facilita a degradação do glicogênio, dentro dessas organelas, que atuam em resposta a demanda para a produção de glicose [Kalamidas, Kotoulas, Kotoulas 1994; Kondomerkos, Kalamidas et al., 2005]. Agentes que elevam o cAMP como o glucagon e adrenalina estimulam a glicofagia no fígado, coração e músculo esquelético, enquanto, que agentes que antagonizam o cAMP, como propranolol e glicose parenteral favorecem alterações opostas [Kotoulas, Kalamidas et al., 2003; Kalamidas, Kondomerkos 2010].

VIA PENTOSE FOSFATO

A via pentose fosfato, também conhecida como via hexose monofosfato, desempenha vários papéis nos organismos vivos, fornecendo uma via alternativa para a oxidação da glicose. Na maioria dos tecidos de 80 a 90% da oxidação da glicose ocorre via glicólise e os restantes 10 a 20% através da via pentose fosfato. Diferentemente, da via glicolítica que gera energia sob a forma de ATP para a demanda energética celular, a via pentose fosfato produz NADPH e ribose-5-fosfato (Ri-5-P). O NADPH é um agente redutor em muitas vias biossintéticas, como de ácidos graxos, esteróis, nucleotídeos e aminoácidos [Patra, Hay 2014; Wamelink, Struys, Jakobs 2008]. Presente no citossol de todas as células, a via pentose fosfato consiste em duas fases: uma fase oxidativa em que há geração de NADPH e Ribose-5-Fosfato e uma segunda etapa não oxidativa de interconversão de carboidratos. A fase oxidativa da via pentose fosfato começa com uma desidrogenação do carbono 1 da glicose-6-fosfato (G6P), uma reação

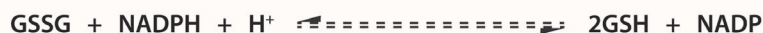
catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), com a concomitante produção de NADPH. A G6PD é altamente específica para NADP. O produto formado a 6-gliconolactona, um éster intramolecular entre a carboxila do carbono 1 com a hidroxila (OH) do carbono 5, pela G6PD é rápida e irreversivelmente hidrolisado por uma lactonase específica para fornecer o 6-fosfogliconato (Figura 10.7).

Figura 10.7 - Fase oxidativa e não oxidativa da via pentose fosfato; 1-Ribulose-5-fosfato epímerase; 2-Ribulose-5-fosfato isomerase; 3-Transcetolase, 4-Transaldolase. 5-Transcetolase

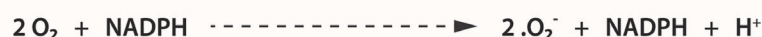


Este é oxidativamente descarboxilado pela 6-fosfogliconato desidrogenase para produzir ribulose-5-fosfato e gás carbônico e NADPH.

Na primeira reação da via forma-se a molécula de NADPH. A G6PD existe sob a forma de monômero que é inativa e sob a forma dimérica que é ativa. Também, foi demonstrado existir sob a forma tetramérica [Cohen, Rosemeyer 1969]. Em muitos tecidos como o fígado, tecido adiposo e glândulas mamárias e adrenal a G6PD está presente em altos níveis [Park, Rho et al., 2005; Hilf, Ickowicz et al., 1975]. A função importante da fase oxidativa da via pentose fosfato é a produção de NADPH, para a proteção contra agentes oxidativos. O fluxo através da via pentose fosfato alcança a máxima porcentagem em tecidos que estão sintetizando esteróis e lipídeos, como fígado, tecido adiposo e as glândulas mamárias e adrenal. No entanto, em todas as células, a taxa basal pode variar na dependência da disponibilidade de NADP, bem como outras condições como exposição a agentes oxidativos e proliferação [Rigante, Gazzano et al., 2012]. A atividade da via pentose fosfato varia de acordo com as necessidades celulares. Assim, a proliferação celular, requer pentose fosfato para a síntese de nucleotídeos e o NADPH, que é requisitado como agente redutor e síntese de ácidos graxos. O NADPH é substrato para a enzima glutathiona redutase (GR) responsável pela regeneração da glutathiona reduzida (GSH) a partir da glutathiona oxidada (GSSG). O GSH é um tripeptídeo requisitado para combater o estresse oxidativo e manter o estado reduzido normal celular:



Dessa forma, as células com reduzidos níveis de G6PD são muito sensíveis ao estresse oxidativo. O NADPH também, serve como substrato para as NADPs oxidases, enzimas produtoras de espécies relativas de oxigênio, ROS (*Reactive Oxygen Species*) [Yen, Wu et al., 2020]. A NADPH oxidase (NOX) é uma enzima multisubunidades, que catalisa a produção de superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), um radical livre usando o NADPH.



A atividade da G6PD é relacionada com a relação NADPH/ NADP⁺. Quando a concentração de NADPH aumenta, algumas moléculas podem se ligar a enzima no lugar do NADP⁺, no entanto, como o NADPH não confere efeitos estabilizadores a atividade da G6PD é reduzida [Kotara, Gover et al., 2005]. Outras enzimas como a isoforma citossólica da enzima málica, da isocitrato desidrogenase citossólica dependente de NADPH, a aldeído desidrogenase são enzimas responsáveis pelo restante de NADPH citossólico produzido [Pollak, Dolle, Ziegler 2007; Stanton 2012].

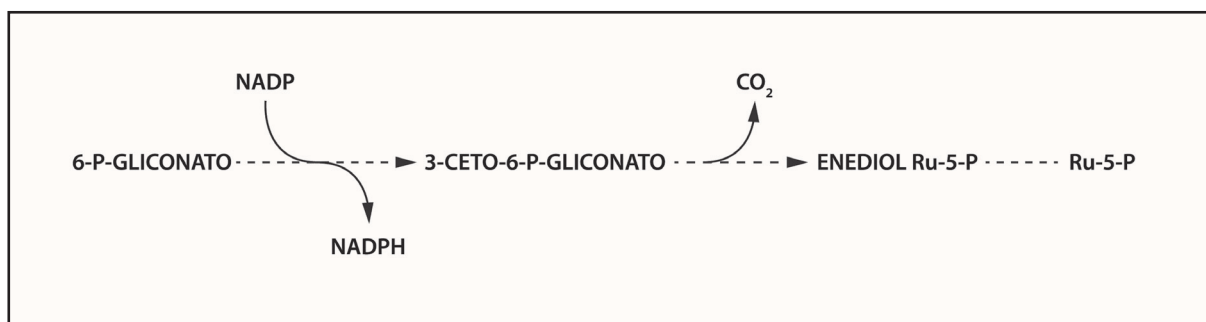
Reação da 6-Fosfogliconolactonase

A enzima 6-fosfogliconolactonase é uma hidrolase, de modo que catalisa a reação de hidrólise de 6-fosfogliconolactona formando o 6-fosfogliconato. A hidrólise é uma reação química importante em biologia, que requer a quebra da ligação O-H da água e a clivagem hidrolítica de uma ligação da molécula alvo [Fatima, Rani et al., 2018]. A molécula 6-fosfogliconolactona é muito susceptível a hidrólise, que ocorre em pH neutro.



Tendo-se em vista, que essa reação é lenta foi identificado ser a enzima 6-fosfogliconolactonase a responsável pela mesma [Brodie, Li, Mann 1955] (Figura 10.8).

Figura 10.8 - As três etapas da reação catalisada pela 6-PGD. Ru-5-P=Ribulose-5-fosfato



Fase não Oxidativa da Via Pentose Fosfato

A segunda fase da via das pentoses fosfatos é uma via não oxidativa de interconversão de metabolitos. A ribulose-5-fosfato formada na fase oxidativa pode sofrer a ação de duas enzimas, a epimerase que a converte em xilulose-5-fosfato e da isomerase que a transforma em ribose-5-fosfato. A epimerase é uma enzima que pode alterar a estereoquímica num átomo de carbono. Estereoisômeros são compostos com a mesma fórmula molecular e ordem de ligação dos átomos, que os constituem, porém com diferentes arranjos desses átomos no espaço. As formas α e β do mesmo monossacarídeo são formas especiais de epimeria, chamado anômeros, diferindo somente na configuração do carbono anomérico. Portanto, epímeros são estereoisômeros, que diferenciam na configuração de somente um carbono assimétrico.



Por outro lado, a ribulose-5-fosfato pode ser transformada em ribose-5-fosfato pela ação de isomerase. Isomerases são enzimas, que catalisam a transferência de um grupo dentro da molécula para fornecer uma forma isomérica.



Essas enzimas estão envolvidas com a movimentação de um grupo ou dupla ligação dentro da molécula. Isso inclui troca de posições de grupo hidroxila e carbonila. Aspentoses, ribulose-5-fosfato, ribose-5-fosfato e xilulose-5-fosfato existem como uma mistura em equilíbrio e podem sofrer transformações catalisadas por duas enzimas, a transcetolase e a transaldolase. A transcetolase catalisa a transferência de duas unidades de carbono (C2), enquanto a transaldolase transfere três unidades de carbono (C3). A transcetolase pertence ao grupo de enzimas que dependem do cofator pirofosfato de tiamina. Essa coenzima catalisa dois processos: a clivagem da ligação carbono-carbono (-C-C-) de uma cetose (substrato doador) e a transferência reversível de um fragmento de dois carbonos (Glicolaldeído) na aldose (substrato aceptor [Kochetov, Solovjeva 2014; Solovjeva, 2023].



A forma biologicamente ativa da vitamina B1 ou tiamina, o pirofosfato de tiamina (ou difosfato de tiamina) é a coenzima da transcetolase. Sendo ela multifuncional, o pirofosfato de tiamina não determina nem a direção nem o substrato específico (ou tipo de substrato) de uma reação catalisada pela transcetolase, o que de preferência depende da apoproteína específica da enzima [Kochetov, Solvjeva 2014].

O que é apoproteína? A atividade catalítica de muitas enzimas, dependem da presença de pequenas moléculas, que recebem o nome de cofatores. Essas enzimas, quando desprovidas desses cofatores é referida como apoenzima (ou apoproteína). A enzima cataliticamente completa é chamada holoenzima:



Os cofatores podem ser de dois grupos: os metais (exemplos, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , etc) ou moléculas pequenas orgânicas (exemplos, Biotina, Pirofosfato de tiamina etc). A reação a seguir é catalisada pela transaldolase. Esta é uma enzima desprovida de núcleo prostético (cofator) que catalisa a transferência reversível de três unidades de carbono (dihidroxiacetona) entre cetoses (doadores) e aldoses (aceptores). Durante a reação forma-se um intermediário covalente, o complexo transaldolase/dihidroxiacetona. Esse intermediário é base de Schiff formado entre o grupo carbonila e amino ácido do resíduo lisina e o grupo carbonila da dihidroxiacetona.

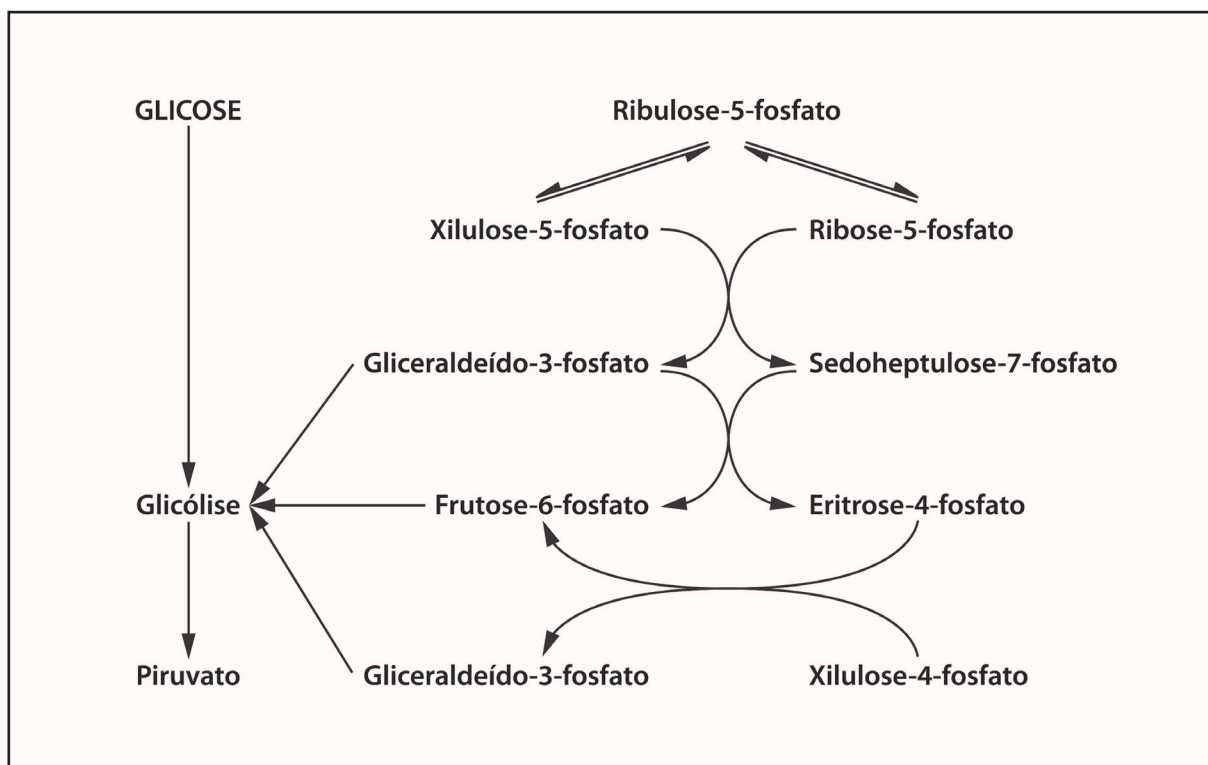


A base de Schiff se torna protonada, a ligação entre C3-C4 é quebrada e uma aldose é liberada. A porção dihidroxiacetona então reage com o grupo carbonila de aldose.



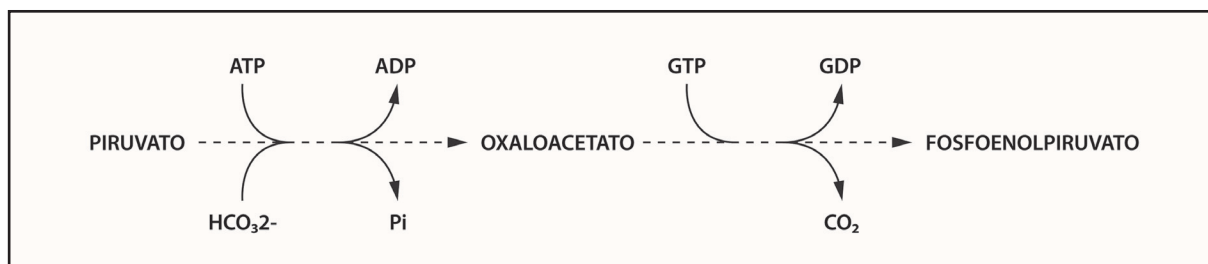
Finalmente, a transcetolase catalisa a reação entre eritrose-4-fosfato e frutose-6-fosfato. Dessa forma, as reações catalisadas pelas enzimas transcetolase e transaldolase ligam a via glicolítica com a via não oxidativa da via pentose fosfato [Horecker 2002] (Figura 10.9).

Figura 10.9 - Inter-relação glicólise e via das pentoses

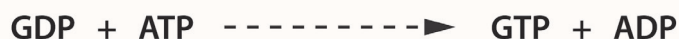


GLICONEOGÊNESE

Gliconeogenese é o termo que se aplica ao processo de produção da glicose a partir de substratos não carboidratos. Entre esses substratos podemos destacar amino ácidos, lactato, glicerol, fontes de carbonos para o processo gliconeogênico. Os níveis sanguíneos de glicose devem ser mantidos dentro de concentrações, que permite aos tecidos, que o usam como substrato primário, tenham seu metabolismo normal, como é o caso de tecidos como cérebro, córnea e testículo, de modo, que a gliconeogênese é um processo essencial para que isso ocorra. As informações sobre o metabolismo, vem de estudos de enzimas e metabolitos. O termo metabolito refere-se a toda molécula pequena, envolvida em reações metabólicas, incluindo substratos intermediários e produtos [Goodacre, Vaidyanaathan et al., 2004]. A gliconeogênese apresenta muitas reações em comum com a glicólise com exceção de três: as reações das hexoquinases (HK), da fosfofrutoquinase (PFK) e da piruvato quinase (PK). O piruvato não pode ser convertido a fosfoenolpiruvato (PEP) pela piruvato quinase, isto porque a reação catalisada pela enzima é irreversível. Contudo, duas enzimas se responsabilizam pela transformação do piruvato em PEP, a saber a piruvato carboxilase (PC) e a fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK).



A piruvato carboxilase (PC) catalisa a conversão de piruvato (Pir) a oxaloacetato (OAA), enquanto, que a PEPCK catalisa a formação de PEP a partir do OAA. A PEPCK utiliza a guanosina trifosfato (GTP) como fornecedora de energia. O GTP é equivalente ao ATP, pois a enzima dinucleotídeo difosfato quinase catalisa a reação de regeneração do GTP:



Por outro lado, o gás carbônico (CO₂) liberado pela reação catalisada pela PEPCK e o bicarbonato (HCO₃⁻) requisitado na reação da PC, estão ligados pela reação catalisada pela anidrase carbônica:



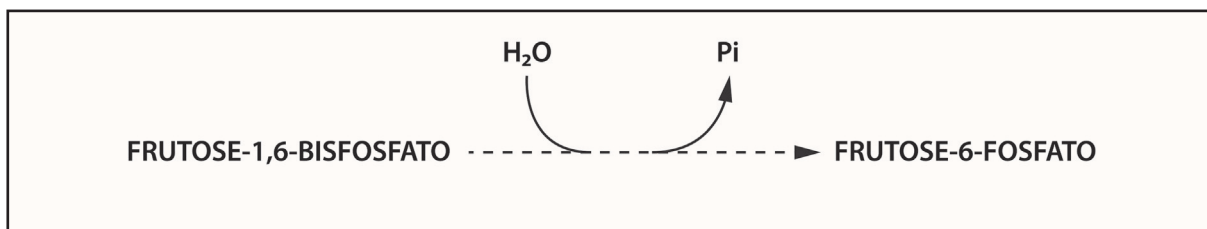
As anidrases carbônicas são metaloenzimas largamente espalhadas, presentes em mamíferos em pelo menos 14 isoformas sendo importante por catalisar a interconversão, entre CO₂ e HCO₃⁻. O íon zinco (Zn²⁺) ligado a hidróxido (E-Zn-OH⁻). A forma ativa ataca o CO₂ formando o HCO₃⁻ coordenado pelo Zn²⁺. O íon HCO₃⁻ então deslocado pela molécula da água é liberado na solução, com a formação da forma cataliticamente inativa da enzima (E-Zn-OH₂) [Pastorekova, Parkkila et al., 2004]. O processo é esquematizado da seguinte forma:



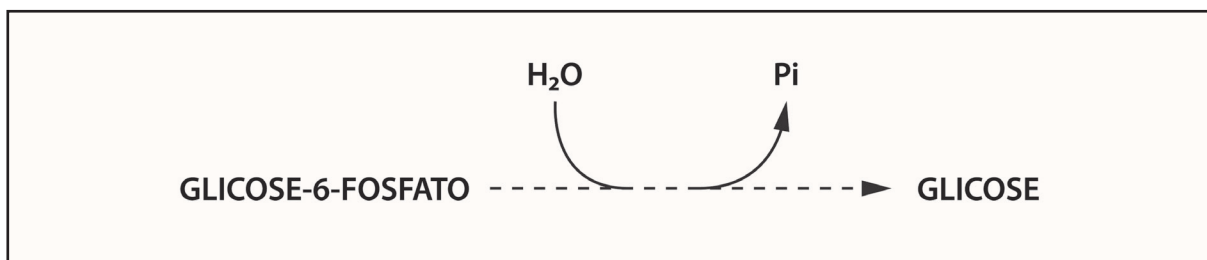
A piruvato carboxilase é uma enzima largamente distribuída entre vertebrados e invertebrados. Seu papel anaplerótico é o de rabastecer o oxaloacetato utilizado direta ou indiretamente via ciclo de Krebs para fins biossintéticos [Wallace, Jitrapakdee, Chapman-Smith 1998]. Em mamíferos, a piruvato carboxilase é encontrada somente na mitocôndria.

A formação do oxaloacetato, pela reação da piruvato carboxilase se dá dentro da mitocôndria, enquanto a gliconeogênese ocorre no citosol. Para que o oxaloacetato seja aproveitado na gliconeogênese, ele é convertido a malato dentro da mitocôndria pela malato desidrogenase (MDH) com o auxílio do NADH. Este malato formado é então transportado para o citosol e aí

é reoxidado a oxaloacetato, agora pela malato desidrogenase citossólica. A fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) é uma enzima que catalisa a descarboxilação e a fosforilação do oxaloacetato dependente de nucleosídeo trifosfato (NTP) para formar o fosfoenolpiruvato (PEP) e nucleosídeo difosfato (NDP). A enzima para catalisar a reação é reversível e requer um cátion divalente como magnésio (Mg^{2+}), ou manganês (Mn^{2+}) [Colombo, Lardy 1981]. A PEPCK pode ser classificada em dois grupos: aqueles que usam preferencialmente o ATP e aqueles que se utilizam do GTP (guanosina trifosfato).



Foram descritos duas isoformas da frutose-1,6-bisfosfatase codificadas por dois genes, a isoforma expressa exclusivamente no fígado e nos rins, enquanto a outra isoforma é expressa nos músculos. A reação catalisada pela frutose-1,6-bisfosfatase requer a presença de um cátion divalente tais como magnésio (Mg^{2+}), manganês (Mn^{2+}) ou zinco (Zn^{2+}) [Kaur, Dahiya, Kumar 2017]. A atividade intracelular da frutose-1,6-bisfosfatase é regulada por dois inibidores, a saber a frutose-2,6-bisfosfato e o AMP. A frutose-2,6-bisfosfato liga a enzima no sítio ativo sendo por conseguinte um inibidor competitivo da enzima, enquanto o AMP liga no sítio alostérico estabilizando a conformação T [Kaur, Dahiya, Kumar 2017]. A terceira reação enzimática irreversível, a ser revertida para a produção de glicose na via gliconeogênica é a catalisada pela hexoquinase, que converte a glicose em glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfatase desempenha um papel central nos tecidos gliconeogênicos, para as etapas finais da glicogenólise e gliconeogênese, na manutenção da homeostase da glicose.



A glicose-6-fosfatase é expressa principalmente nos tecidos gliconeogênicos, fígado e córtex renal [Hers, de Duve 1950]. Também é expressa nas células beta das ilhotas pancreáticas [Khan, Hong-Lie, Landau 1995], bem como na mucosa intestinal de humanos e ratos [Ockerman 1965; Chatelain, Pegorier et al., 1998]. A glicose-6-fosfatase é uma hidrolase microsomal identificada como um polipetideo de 36 KDa, cuja atividade é o resultado da ação de pelo menos duas proteínas de membrana do retículo endoplasmático: uma subunidade catalítica de 36 KDa (P36) e uma subunidade translocase de 46 KDa (P 46, G6PT-1) [van der Werve, Lange et al., 2000]. Microsomos são pequenas vesículas membranosas produzidas por fragmentação, principalmente do retículo endoplasmático, durante a homogeneização de células eucariotas. A glicose, o produto da reação catalisada pela glicose-6-fosfatase se comporta como um inibidor não competitivo da enzima [Beaufay, Hers et al., 1954; Arion, Wallin 1973]. Dois ciclos são considerados importantes na via gliconeogênica, o ciclo do lactato-glicose (conhecido como ciclo de Cori) e o ciclo alanina-glicose (ciclo da alanina). Ambos os ciclos fornecem glicose para a via sanguínea, que chega aos tecidos que requerem a glicose como suas fontes primárias de energia. O ciclo de Cori retrata a utilização pelo fígado do lactato formado nos músculos,

pela via glicolítica. Esse lactato formado nos músculos chega ao fígado via corrente sanguínea, onde é transformado a piruvato, pela enzima lactato desidrogenase (LDH) que segue o caminho gliconeogênico para produção de glicose.



Estudos em humanos mostraram que a contribuição do lactato para a glicose plasmática varia de 7 a 18% dependendo das condições alimentares [Consoli A, Nurjhan 1990a; Jenssen, Nurjhan 1990]. No indivíduo diabético tipo 2, há um aumento da utilização do lactato na produção de glicose [Consoli, Nurjhan et al., 1990b]. Relativamente ao ciclo da alanina, este amino ácido formado no catabolismo muscular é liberado para a circulação, chega ao fígado onde sofre desaminação formando o piruvato [Felig, Pozefsky et al., 1970].



É uma reação de transaminação catalisada pela glutamato alanina aminotransferase. A reação ocorre com a formação de base de Schiff tendo como cofator o fosfato de piridoxal. A contribuição da alanina para a produção de glicose é por volta de 11% do amino ácido após jejum de uma noite para humanos saudáveis [Consoli, Nurjhan et al., 1990a; Jenssen, Nurjhan et al., 1990]. O glicerol proveniente da hidrólise de triglicéroides é também um precursor de glicose pela via gliconeogênica. O glicerol é convertido a glicerol-3-fosfato, numa reação catalisada pela enzima glicerol quinase [Dipple, Zhang et al., 2001]. Uma vez formado pela reação da glicerol quinase, o glicerol-3-fosfato é convertido a dihidroxiacetona fosfato, numa reação catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase. Vamos lembrar que a dihidroxiacetona fosfato é um intermediário da via glicolítica e gliconeogênica.



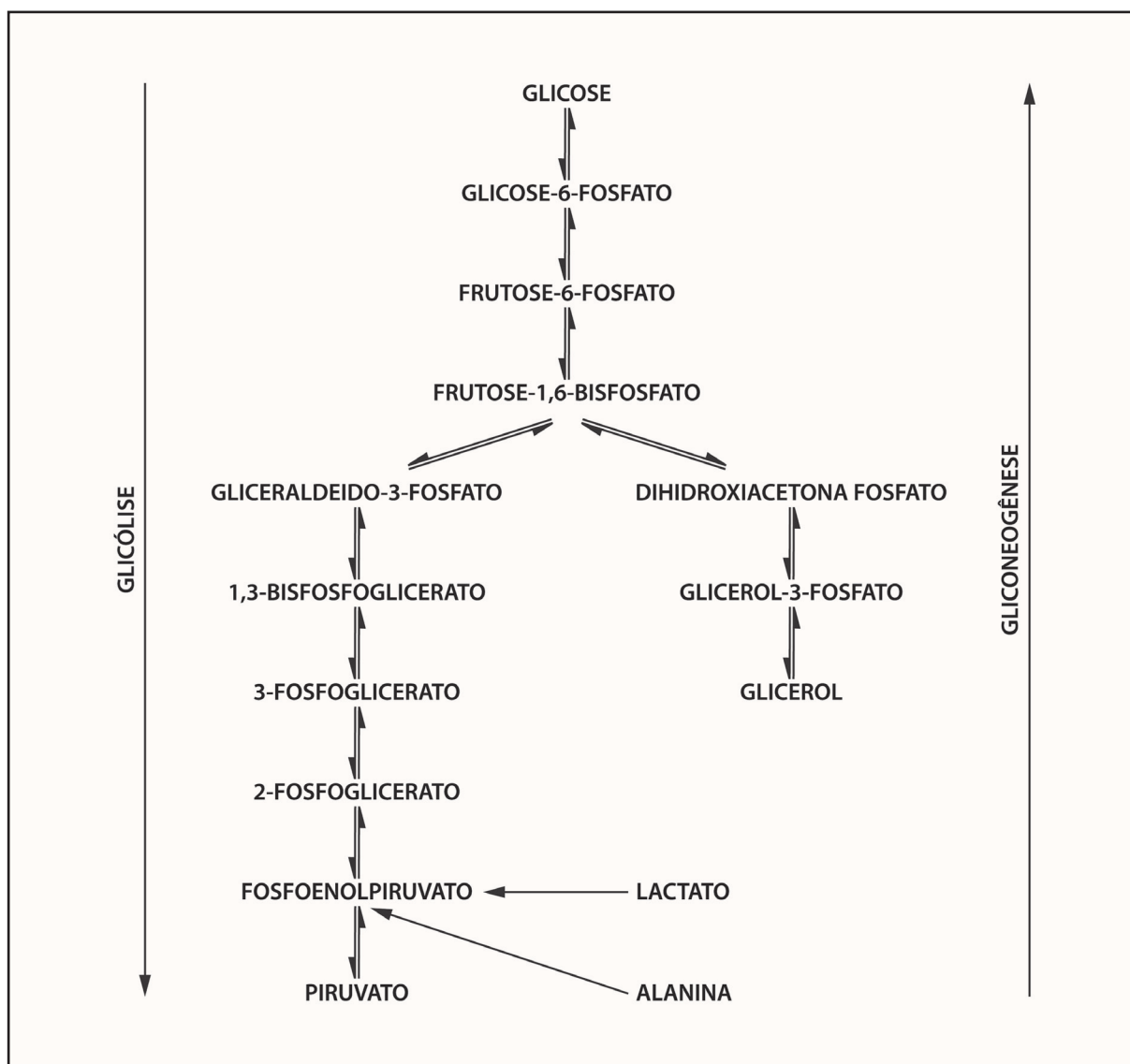
Tanto o fígado quanto os rins apresentam alta expressão de glicerolquinase, de modo que o glicerol pode contribuir diretamente para a produção de glicose nesses dois órgãos gliconeogênicos [Uhlen, Fagerberg et al., 2015].

Regulação da gliconeogênese

As enzimas da gliconeogênese envolvidas na reversão das reações irreversíveis da glicólise são os locais onde ocorre a regulação da via gliconeogênica, a saber a piruvato carboxilase, a

fosfoenolpiruvato carboxi quinase, a frutose-1,6-bisfosfatase e a glicose-6-fosfatase. A regulação da gliconeogênese tem muita semelhança com a regulação da glicólise (Figura 10.10)

Figura 10.10 - Metabolismo da glicose contextualizando a glicólise e gliconeogênese



Assim, a inibição das enzimas glicolíticas que catalisam as reações irreversíveis da glicólise ou a repressão da síntese das enzimas, aumenta a efetividade da gliconeogênese. A acetil-CoA formada pelo metabolismo dos ácidos graxos e o NADH são ativadores da piruvato desidrogenase quinase, uma enzima, que fosforila a piruvato quinase inativando-a prevenindo dessa forma, a conversão do piruvato a acetil-CoA, sobrando mais piruvato para a gliconeogênese. O excesso de citrato, por outro lado, é um efector alostérico negativo da fosfofrutoquinase, reduzindo a concentração a de frutose-1,6-bisfosfato um ativador da piruvato quinase.

Os hormônios, glucagon e insulina, também regulam a gliconeogênese hepática influenciando o estado de fosforilação das enzimas sujeitas a modificação covalente. Vejamos como exemplo a piruvato quinase, que é ativa quando desfosforilada e inativa quando fosforilada. O glucagon ativa a adenilato ciclase formando o cAMP, que por sua vez ativa a proteína quinase A que fosforila a piruvato quinase inativando-a. A relação glucagon/insulina alta no sangue aumenta a capacidade para gliconeogênese e decresce a da glicólise hepática. Já uma relação baixa tem o efeito oposto.

CICLO DE KREBS

Vimos anteriormente que o metabolismo anaeróbico através da via glicolítica produz apenas uma fração da energia, que é disponibilizada pela glicose. O processamento completo da glicose com os seus derivados ocorre no ciclo de Krebs, também conhecido como ciclo do ácido cítrico e ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Por que o nome ciclo de Krebs? Krebs e seu colaborador Johnson, publicaram em 1937 uma pesquisa mostrando quais intermediários fazem parte do metabolismo aeróbico. Daí o nome ciclo de Krebs em sua homenagem [[Krebs, Johnson 1937]. O ciclo de Krebs consta de uma série de reações químicas, que é a etapa final para a oxidação das moléculas combustíveis, como ácidos graxos, amino ácidos e carboidratos. Qual seria a função do ciclo de Krebs transformando moléculas combustíveis em energia (ATP)? Como a energia provém da oxidação de compostos constituídos por carbono (moléculas combustíveis), os quais podem perder elétrons, isto é, podem ser oxidados, o ciclo de Krebs envolve uma série de reações químicas, que resultam na oxidação de grupo acetila produzindo duas moléculas de gás carbônico (CO_2). Então, a acetil-CoA é o combustível para o ciclo de Krebs, que pode ser formado pela degradação de carboidratos, ácidos graxos e alguns aminoácidos.

O piruvato, formado em condições anaeróbicas pela via glicolítica é convertido a lactato. No entanto, em condições aeróbicas o piruvato é transformado na mitocôndria, pela enzima piruvato desidrogenase a acetil-coenzima A (acetil-CoA), que pode reagir com o oxaloacetato para formar o primeiro substrato do ciclo de Krebs. Outro caminho para o piruvato é a sua carboxilação formando o OAA, pela enzima piruvato carboxilase (PC), que representa a principal via anaplerótica para o reabastecimento de intermediários do ciclo de Krebs [Cappel, Dejas et al., 2019]. Embora a glicólise seja a principal fonte de piruvato, existem outras fontes menores, como a conversão do lactato a piruvato pela enzima lactato desidrogenase, a conversão da alanina pela alanina transaminase e a conversão do malato pela enzima málica, mitocondrial e citossólica. Dentro da mitocôndria, o piruvato é metabolizado. Para entrar na mitocôndria o piruvato precisa primeiro passar pela membrana mitocondrial externa, que requer o canal de anions dependente de voltagem VDAC (Voltage Dependente Anion Channel). Nesse canal a entrada de piruvato é feita por troca com hidroxila (OH^-). Vencida essa etapa, o piruvato tem que passar pela membrana mitocondrial interna e isso é possível pelo transportador de piruvato MPC (Mitochondrial Pyruvate Carrier). Nas reações de oxido-redução que ocorrem no ciclo de Krebs bem como, nas beta-oxidações de ácidos graxos há a geração de equivalentes redutores NADH e FADH_2 , os quais transferem elétrons para a cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória) onde são formadas 30 moléculas de ATP por molécula de glicose.

Reação Catalisada pela Piruvato Desidrogenase

A enzima piruvato desidrogenase (PDH) executa um papel importante no metabolismo celular, não somente no que diz respeito a homeostase de energia, mas também, no fornecimento de átomos de carbono para os processos biossintéticos. A PDH é um complexo proteico composto por quatro subunidades: a subunidade piruvato desidrogenase (E-1); a subunidades dihidrolipoamida acetil transferase (E-2); a subunidades dihidrolipoamida desidrogenase (E-3) e a subunidade proteica ligadora de E-3 (E3BP) [Patel, Korotchkina, Sidhu 2009].

O mecanismo de reação catalisada pela PDH é complexo e requer a participação de três enzimas e as coenzimas pirofosfato de tiamina (TPP), ácido lipoico e FAD, bem como CoA e NAD. O sítio de E1 encontra-se numa fenda profunda formado na interface entre duas subunidades (a subunidade α e a subunidade β) e tem o pirofosfato de tiamina e magnésio [Gray, Tompkins, Taylor 2014]. O precursor imediato da acetil-CoA é o piruvato a partir de fontes de carboidratos,

pela via glicolítica. A conversão do piruvato à acetil-CoA envolve três etapas; a descarboxilação, a oxidação e a transferência do grupo acetila resultante para a coenzima A (CoA).

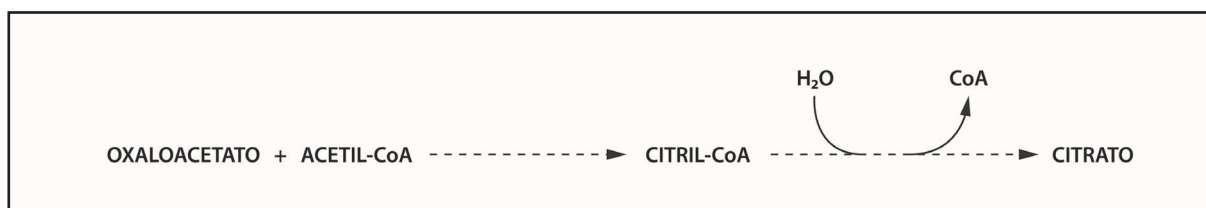
Essas três etapas devem ser acopladas com a finalidade de preservar a energia livre derivada da descarboxilação para guiar a formação de NADH e acetil-CoA. A descarboxilação do piruvato tem início na subunidade E1. O piruvato combina com o TPP e é então descarboxilado. Esta é uma reação acoplada com a acetilação redutiva do cofator lipoamida. Este cofator é o ácido lipoico ligado a resíduo lisina da proteína. A subunidade E2 é constituída por quatro subdomínios, conectados entre si por um braço flexível, começando no C-terminal incluindo um domínio interior um domínio de ligação e dois domínios de lipoil [Gray, Tompkins, Taylor 2014]. A subunidade E2 catalisa a transferência de grupo acetila da porção do lipoato à CoA, formando então a acetil-CoA. A subunidade E3 catalisa a regeneração do lipoato da hidroxilipoamida. A oxidação do dihidrolipoato é realizada pela redução da flavina adenina dinucleotídeo oxidado (FAD) para a forma reduzida (FADH₂) uma reação catalisada pela dihidrolipoamida desidrogenase. O FAD é regenerado pela reação com o NADH [Odievre, Chretien, Munnich 2005].

A atividade da PDH pode ser regulada pela fosforilação/desfosforilação, pelas enzimas piruvato desidrogenase quinase (PDK) e pela piruvato desidrogenase fosfatase. A fosforilação da PDH reduz sua atividade resultando na redução do fluxo através dessa enzima.

Foram descritos quatro isoformas de PDH: PDK1-PDK4 [Rowles, Scherer et al., 1996; Gudi, Bowker-Kiley et al., 1995]. As quatro isoformas são encontradas no coração e músculo esquelético, porém as isoformas PDK2 e PDK4 são as que predominam. PDK3 é expresso somente no coração, enquanto PDK2 é expresso no coração, fígado e músculo esquelético. O PDK4 é expresso nos rins, cérebro e fígado [Wynn, Kato et al., 2008; Green, Grigorian et al., 2008]. A piruvato desidrogenase fosfatase é a enzima responsável pela desfosforilação da piruvato desidrogenase reativando-a. A acetil-coenzima A (acetil-CoA) formada entra no ciclo de Krebs. As enzimas do ciclo de Krebs localizam-se na matriz mitocondrial. As seguintes enzimas fazem parte do ciclo de Krebs: citrato sintase; aconitase; isocitrato desidrogenase; alfa-cetoglutarato desidrogenase; succinil-CoA sintase; succinato desidrogenase; fumarase e malato desidrogenase [Akram 2014].

Reação Catalisada pela Citrato Sintase

O ciclo de Krebs tem início com a formação de citrato, uma reação de condensação entre oxaloacetato (OAA) e acetil-coenzima A, catalisada pela enzima citrato sintase. Nesta reação, uma unidade de quatro átomos de carbono (OAA) se condensa com uma unidade de dois átomos de carbono, o grupo acetila da acetil-CoA com formação de um intermediário tioéster de alta energia, a citril-CoA, que é por sua vez hidrolisada para citrato e coenzima A.



A cinética da enzima citrato sintase é de forma sequencial ordenada, isto é, o oxaloacetato é o primeiro substrato a se ligar a enzima, através de muitas ligações com resíduos de amino ácidos que o circunda na bolsa de ligação por meio de ligação de hidrogênio com resíduos de histidina e arginina [Duckworth, Nguyen et al., 2013]. A ligação do oxaloacetato induz

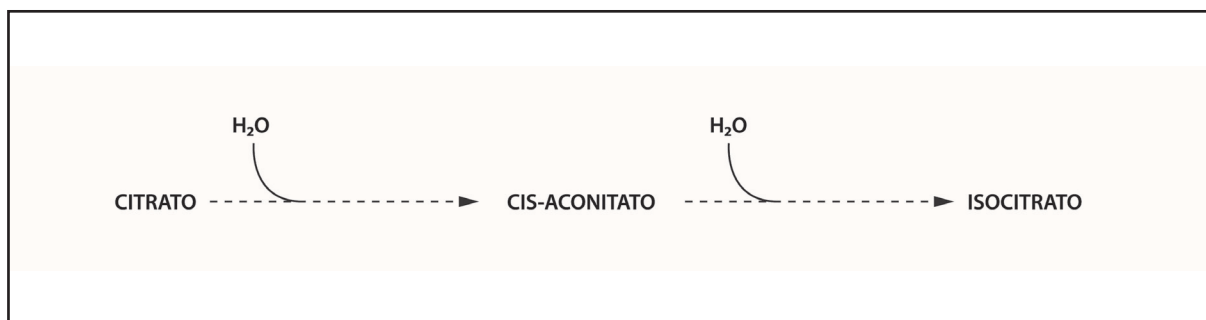
alterações estruturais na enzima levando a criação do sítio de ligação para acetil-CoA. A forma aberta, que a enzima apresenta antes de sua ligação com o oxaloacetato é convertida a uma forma fechada, após a ligação do oxaloacetato. No mecanismo de reação catalisada pela citrato-sintase, resíduos de histidina e arginina participam da reação doando prótons aos reagentes. Concentrações altas de citrato, na mitocôndria pode inibir a piruvato desidrogenase e a succinato desidrogenase [Williams, O'Neill 2018]. O citrato pode ser exportado da mitocôndria através de um transportador mitocondrial de citrato (também conhecido como família de carregadores de soluto-1 (SLC25a1), em troca pelo malato [Palmieri 2004].

Uma vez no citosol, o citrato é convertido a oxaloacetato e acetil-CoA, pela ação da enzima citrato liase. A acetil-CoA pela ação da acetil-CoA carboxilase é transformada em malonil-CoA, que é um precursor da síntese de ácidos graxos. O oxaloacetato citossólico, pode sofrer a ação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e seguir a via gliconeogênica. Por outro lado, o oxaloacetato pode ser transformado a malato, pela malato desidrogenase, e voltar para a mitocôndria. No citosol, o citrato pode inibir a fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) e a fosfofrutoquinase-2 (PFK-2), bem como a piruvato quinase (PK) enzimas da via glicolítica [Williams, O'Neill 2018]. Enquanto o citrato inibe vias que produzem o ATP, ele estimula as vias consumidoras de ATP. O citrato pode ativar alostericamente a acetil-CoA carboxilase e a enzima gliconeogênica frutose-1,6-bisfosfatase [Martin, Vagelos 1962; Iacobazzi, Infantino 2014]. Srere, cunhou o termo “metabolon” para definir o complexo supramolecular de enzimas metabólicas sequenciais da célula [Srere 1985]. Esse complexo favorece o transporte dos reagentes do sítio ativo de uma enzima para o sítio ativo da outra enzima [Schoffelen, van Hest 2012]. O complexo proteico de MDH e CS é formado com a finalidade de canalizar o oxaloacetato do sítio ativo da malato desidrogenase para o sítio ativo da citrato-sintase. Dessa forma, a molécula contendo quatro átomos de carbono, o oxaloacetato vai se condensar com um grupo de dois átomos de carbono da acetil-CoA para formar a molécula de citrato liberando, por conseguinte a coenzima A [Kornberg 1987; Robinson, Srere 1985]. A canalização do oxaloacetato entre a malato desidrogenase e citrato sintase não somente leva ao alto fluxo de oxaloacetato ao longo da via para vencer a termodinâmica desfavorável, mas protege também os reagentes da competição de outras enzimas [Huang, Huber et al., 2017].

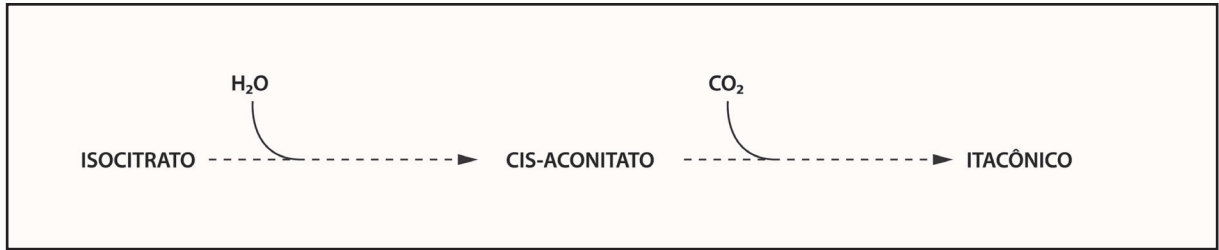
Reação Catalizada pela Aconitase

A etapa seguinte do ciclo de Krebs é a reação de isomerização reversível de citrato e isocitrato, com a formação do intermediário cis-aconitato. O citrato apresenta um plano de simetria e por isso não é oticamente ativo, no entanto é proquiral: a aconitase pode distinguir entre citrato S e R. Aos quatro substituintes de um carbono assimétrico (quiral) é atribuído prioridade de acordo com o número atômico. A configuração acerca do carbono assimétrico é chamada configuração S, do latim Sinister para a esquerda se a progressão da mais alta prioridade para a menor foi no sentido anti-horário. A configuração R do latim Rectus para a direita e progressão no sentido horário. Proquiral é um carbono que não é oticamente ativo, mas pode se tornar oticamente ativo pela adição de um grupo estéreo-específico. Portanto, uma molécula é chamada de quiral (assimétrica) se sua imagem não puder se sobrepor a uma superfície refletora. O citrato formado pela condensação de oxaloacetato e acetil-CoA é convertido a isocitrato, via cis-aconitato, pela enzima aconitase ou aconitato hidratase [Akram 2014].

A isomerização se processa em duas fases: uma fase de desidratação e outra fase de hidratação.



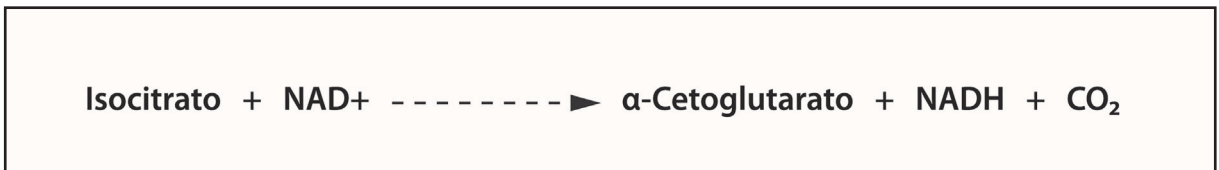
A aconitase (ou aconitato hidratase) de mamíferos, que existe na mitocôndria (mAconitase) e no citossol (cAconitase) são metaloproteínas contendo como grupo prostético ferro e enxofre. A isoenzima mitocondrial funciona no ciclo de Krebs, já a aconitase citossólica, além de atuar na isomerização citrato-isocitrato, também funciona na homeostase do ferro. O grupo prostético ou centro [4Fe-4S] apresenta um dos átomos de ferro não ligado a resíduo de amino ácidos, ficando livre para ligar átomos de oxigênio do substrato ou água. A isoenzima mitocondrial é uma proteína globular dobrada em quatro domínios: o domínio 1 é constituído dos resíduos 1-200; o domínio 2 dos resíduos 201-319; o domínio 3 dos resíduos 320-512 e o domínio 4 dos resíduos 513-536. O domínio 3 contém três resíduos de cisteína (Cys), que ligam o grupo prostético [Castro, Tortora et al., 2019]. A atividade da aconitase pode ser regulada das seguintes maneiras: ativação/desativação devido a montagem e desmontagem do centro [4Fe-4S], ou substituição do ferro por outros metais; inativação devido a modificações dos resíduos de cisteína e tirosina; inibição competitiva por ácidos di e tricarboxílicos; sua expressão pode ser regulada a nível de transcrição [Matasova, Popova 2008]. Outra forma de regulação da aconitase é a fosforilação dependente de proteína quinase C (PKC). Evidências mostram alterações em duas proteínas no coração de ratos diabéticos, mediados pelo PKC. Essas duas proteínas foram identificadas como sendo a creatina quinase e a aconitase mitocondrial. A fosforilação da aconitase mitocondrial altera sua atividade, de tal forma a limitar o ciclo de Krebs mitocondrial. A fosforilação da aconitase aumenta a atividade reversa, isto é, a isomerização de isocitrato para citrato [Lin, Brownsey, MacLeod 2009]. A aconitase mitocondrial é muito sensível as espécies reativas sendo que o acúmulo de espécies reativas, como o superóxido, induzido na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, reduz a atividade da aconitase e consequentemente a redução do ciclo de Krebs [Walden 2002]. Durante a reação de isomerização citrato-isocitrato, catalisada pela enzima aconitase (ou aconitato hidratase), forma-se um intermediário, o cis-aconitato, o qual não se dissocia da enzima. O cis-aconitato foi identificado como um precursor do itaconato, que se forma pela descarboxilação catalisada pelo gene imunoresponsivo-1, IRG-1 (Imune Responsive Gene) [Cordes, Wallace et al., 2016; Daniels, Kofman et al., 2019; Lampropoulou, Sergushichev et al., 2016]. O itaconato foi descrito como um metabolito de mamíferos, detectado em grande quantidade em macrófagos, ativados ou não por lipopolissacarídeos [Strelko, Lu et al., 2011]. A descoberta do eixo gene imunoresponsivo-1 (IRG-1)-itaconato, e o fato do IRG-1 ser altamente expresso em macrófagos de mamíferos, durante o processo inflamatório, sugeriu uma função ao itaconato relacionada a propriedades antibacterianas. Também foi verificado que o IRG-1 codifica uma enzima que responde pela produção de itaconato [Michelucci, Cordes et al., 2013]. O IRG-1 é encontrado na mitocôndria [Degrandi, Hoffman et al., 2009]. O ácido itacônico tem bioatividade antimicrobiana e anti-inflamatória [Cordes, Michelucci, Hiller 2015; Hooftman, O'Neill 2019]. A via biossintética do ácido itacônico compreende as seguintes fases: primeiro o ácido cítrico é produzido pela condensação entre oxaloacetato e acetil-CoA, catalisada pela enzima citrato sintase. O ácido cítrico é convertido a ácido cis-aconítico, pela enzima aconitase, no ciclo de Krebs. O cis aconítico é descarboxilado pela enzima cis-aconítico descarboxilase, resultando no ácido itacônico.



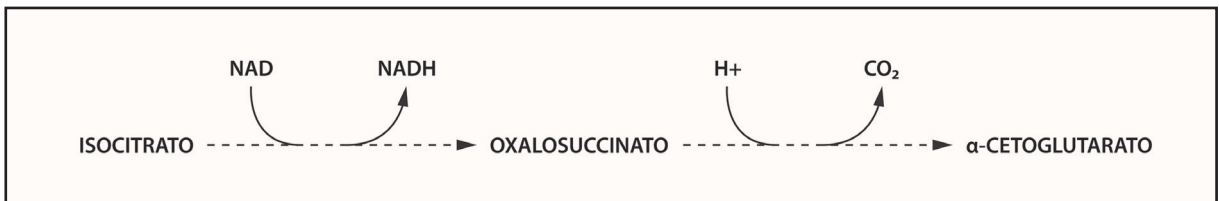
O itaconato é um inibidor da succinato desidrogenase, prevenindo a oxidação do succinato para fumarato, reduzindo dessa forma a atividade da cadeia respiratória [Lampropoulou, Sergushichev et al., 2016; Cordes, Wallace et al., 2016]. O ácido itacônico pode deixar a mitocôndria indo ao citossol, onde inibe algumas enzimas glicolíticas, como a aldolase, a lactato desidrogenase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [Olagnier, Brandtoft et al., 2018; Mills Ryan et al., 2018; Liao, Han et al., 2019]. Peace, O'Neill 2022].

Reação Catalisada pela Isocitrato Desidrogenase

A isocitrato desidrogenase (IDH) é a enzima responsável pela catálise da primeira reação de oxido-redução do ciclo de Krebs, a descarboxilação oxidativa do isocitrato.



Nessa reação há a formação de um intermediário, o oxalosuccinato, um beta ácido instável. Ainda ligado à enzima, o oxalosuccinato perde CO₂ transformando-se em α-cetoglutarato.



A isocitrato desidrogenase humana existe sob três isoformas, IDH-1, IDH-2 e IDH-3. As isoformas IDH-1 e IDH-2 usam como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) e funcionam como homodímeros.

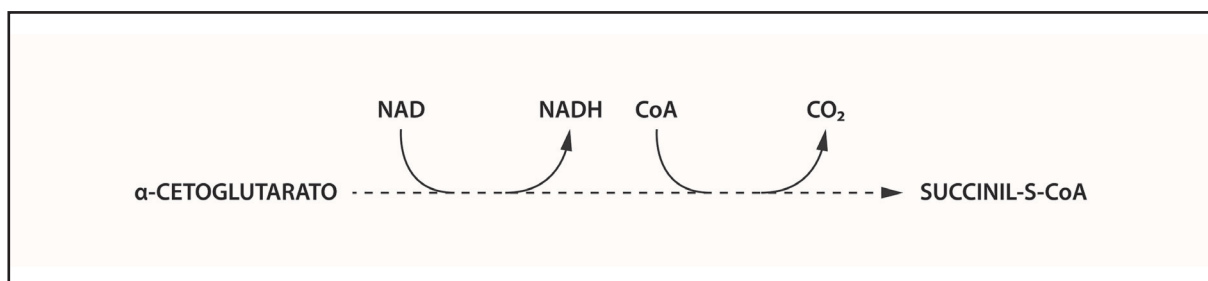
Suas localizações são diferentes, a IDH-1 é a isoforma citossólica e peroxissomal, enquanto a IDH-2 é a isoforma mitocondrial [Geisbrecht, Goud 1999]. A isoforma IDH3 é também mitocondrial, porém diferentemente das outras duas isoformas ela usa como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Ela catalisa uma reação irreversível, ao contrário das outras isoformas que catalisam reações reversíveis [Bergaggio, Piva 2019]. A isoforma IDH-1 existe como um homodímero, apresentando dois domínios por monômero. Esses dois domínios são ligados entre si por uma estrutura β-laminada [Nekrutenko, Hillis et al., 1998]. O equilíbrio da reação é fortemente favorável para a formação do α-cetoglutarato. A subunidade α é a subunidade catalítica [Cohen, Colman 1972], enquanto as subunidades β e γ são reguladoras [Erlich, Colman 1981]. A IDH é alostericamente estimulada pelo ADP, o qual intensifica a afinidade da enzima

pelo substrato. A ligação de isocitrato, NAD, Mg^{2+} e ADP é mutuamente cooperativa.

Reação Catalisada pela α -Cetoglutarato Desidrogenase

O α -cetoglutarato é formado a partir do isocitrato numa reação catalisada pela enzima isocitrato desidrogenase. O α -cetoglutarato é um ácido fraco, contendo dois grupos carboxílicos e um grupo cetônico, daí também ser chamado ácido 2-oxoglutarato e ácido 2-cetoglutarico. O α -cetoglutarato desempenha um papel muito importante, como participante de processos metabólicos, que inclui dentre outros, a de defesa antioxidante, produção de energia e metabolismo de amino ácidos [Legendre, MacLean, Appanna 2020]. O α -cetoglutarato é um antioxidante, que desempenha um papel vital neutralizando as espécies radicais de oxigênio no organismo. As enzimas α -cetoglutarato desidrogenase e glutamato desidrogenase, trabalham em sequência para modular o antioxidante α -cetoglutarato durante o estresse oxidativo [Mailloux, Singh et al., 2009]. Evidências apontam para um papel de detoxificação do α -cetoglutarato nos danos pulmonares causados pela amônia.

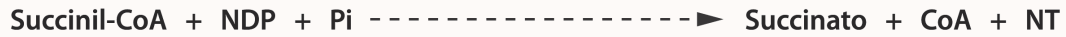
Outro aspecto que merece atenção é a atuação em sequência do α -cetoglutarato desidrogenase e glutamato desidrogenase para modular a ação antioxidante do α -cetoglutarato durante o estresse oxidativo, uma vez que no estresse oxidativo a enzima α -cetoglutarato desidrogenase está reduzida [Mailloux, Singh et al., 2009]. A conversão do α -cetoglutarato para succinil-CoA é catalisada pelo complexo α -cetoglutarato desidrogenase. Esse complexo enzimático catalisa a descarboxilação oxidativa de α -cetoglutarato, liberando a segunda molécula de NADH e gás carbônico (CO_2). Na realidade, a α -cetoglutarato desidrogenase é um complexo formado por três subunidades: a subunidade E1 (α -cetoglutarato desidrogenase), a subunidade E2 (dihidrolipoil transacetilase) e a subunidade E3 (dihidrolipoamida desidrogenase).



Os seguintes fatores atuam junto às enzimas: o pirofosfato de tiamina (TPP), fortemente ligado na subunidade E1; ácido lipóico, ligado covalentemente a subunidade E2; coenzima A (CoA), que interage com o grupo succinila no ácido lipóico; a flavina adenina dinucleotídeo, fortemente ligado a subunidade E3; NAD que é reduzido a NADH pelo FADH₂, na reação regenerativa de FAD. O mecanismo da reação catalisada pela α -cetoglutarato desidrogenase é idêntico à catalisada pela piruvato desidrogenase. O α -cetoglutarato é ligado covalentemente ao TPP na subunidade E1. A ligação inicia o processo de descarboxilação do α -cetoglutarato para formar CO_2 e o grupo succinila ligado covalentemente. O grupo succinila é então transferido ao ácido lipoico oxidado. A CoA reage com o grupo succinila formando o succinil-CoA, reduzindo o ácido lipoico. O ácido lipoico reduzido, subsequentemente reduz um grupo sulfidrílica na unidade E3. Os equivalentes redutores são então transferidos ao FAD ligado. Finalmente o FADH₂ reduz o NAD para NADH completando o ciclo catalítico [Waskiewicz, Hammes 1984; Perham 1991; McLain, Szweda, Szweda 2011]. A α -cetoglutarato desidrogenase é regulada pela concentração intracelular de cálcio. A ativação da enzima resulta num aumento do fornecimento de NADH para a cadeia respiratória, ajustando a taxa do metabolismo [Duchen 1992].

Reação Catalisada pela Succinato-CoA Sintetase

A succinato-coenzima A sintetase, também conhecida como succinil tioquinase catalisa a hidrólise da succinil-coenzima A (succinil-CoA) um composto de alta energia conferida pela ligação tio-éster. Ela catalisa a reação reversível:



A condição, rico em energia da ligação tio-éster é conservada pela fosforilação de GDP, um processo conhecido como fosforilação a nível de substrato. A reação de catálise da succinil-CoA sintetase ocorre em três etapas da seguinte forma:

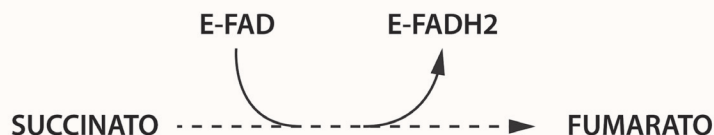


O E representa a enzima, - ligação covalente e · interação não covalente.

Em cada uma dessas etapas a energia livre da succinil-SCoA de alta energia é conservada através de sucessivas formações de compostos de alta energia: primeiro a succinil-fosfato, depois a fosfohistidina e finalmente o GTP. Duas subunidades diferentes, α e β compõem a succinil-CoA sintetase. No sítio ativo da enzima tem um resíduo de histidina que é essencial para a reação, sendo transitoriamente fosforilada para manter a alta energia. O resíduo de histidina localiza-se numa alça entre as interfaces das subunidades α e β .

Reação Catalisada pela Succinato Desidrogenase

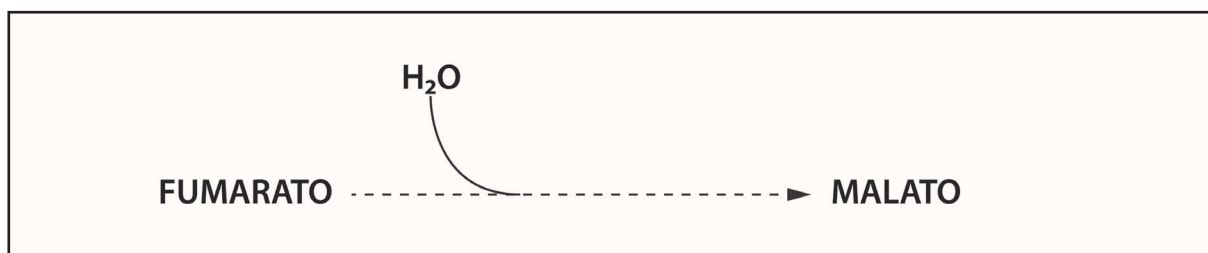
O complexo succinato desidrogenase, também conhecido como complexo II ou succinato: quinona oxidoreductase, é uma enzima componente da cadeia respiratória aeróbica, juntamente com o complexo I (NAD desidrogenase), complexo III (citocromo C redutase) e complexo IV (citocromo C oxidase). A succinato desidrogenase é uma enzima que acopla a reação de oxidação do succinato no ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos com transferência de elétrons na cadeia respiratória ou cadeia de transporte de elétrons. A succinato desidrogenase é um complexo proteico heterotetramérico, integral de membrana. Quatro subunidades formam o complexo succinato desidrogenase de humanos: o SDHA, SDHB, SDHC e SDHD. A subunidade SDHA é uma flavoproteína, que contém como cofator (grupo prostético) o FAD, a subunidade SDHB é uma proteína ferro-enxofre (Fe-S), enquanto as subunidades SDHC e SDHD são duas proteínas pequenas integrais de membrana [Lemire, Oyedotun 2002; Sun, Huo et al., 2005].



A succinato desidrogenase catalisa, no ciclo de Krebs a desidrogenação do succinato com formação de fumarato. Diferentemente das outras desidrogenases, que usam o NAD como aceptor de hidrogênio, a succinato desidrogenase usa como aceptor o FAD. Na subunidade SDHA, o FAD se encontra ligado covalentemente a um resíduo de histidina (His) do sítio ativo. Esta ligação covalente aumenta o potencial redox da enzima para permitir a oxidação do succinato [Tomasiak, Maklashina et al., 2008; Kim, Jeong, Winge 2012; Hagerhall 1997]. Evidências, apontam para a atuação de dois fatores na montagem da succinato desidrogenase, a SDHAF1 e SDHAF2. Esses dois fatores atuam na inserção do centro Fe-S e do FAD nas subunidades SDHB e SDHA respectivamente [Hao, Khalimonchuc et al., 2009; Ghezi, Goffrini et al., 2009]. A atividade catalítica da succinato desidrogenase é modulada por fosforilação pós-tradução e acetilação, modificações que atenuam a atividade [Tomitsuka, Kita, Esumi 2009]. A atividade catalítica da succinato desidrogenase, também é modulada por intermediários do ciclo de Krebs, incluindo o oxaloacetato um potente inibidor. Por sua vez o succinato promove a dissociação do oxalato da succinato desidrogenase, o que resulta na reativação da atividade da enzima. Já o ATP ativa a enzima num processo que não envolve a fosforilação [Huang, Millar 2013].

Reação Catalisada pela Fumarase

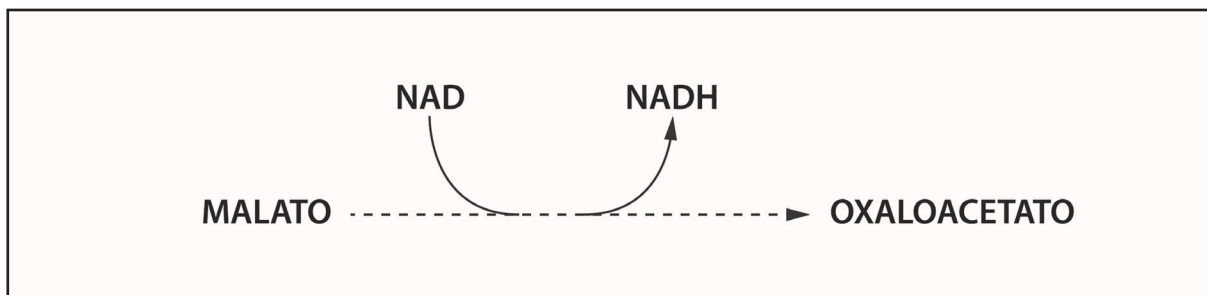
A fumarase ou fumarato hidratase é uma enzima, que catalisa a sétima reação do ciclo de Krebs, isto é, a adição trans estereoespecífica de um átomo de hidrogênio e um grupo hidroxila no fumarato, que é convertido a malato. A reação é livremente reversível.



A fumarase é uma enzima encontrada em mais de um compartimento, isto é, ela é encontrada tanto na mitocôndria quanto no citosol, um fenômeno denominado alvo duplo ou alvo bimodal ou dupla localização. Posteriormente foi também chamada ecoformas ou ecoproteínas, indicando uma repetição da mesma proteína (echo em grego significa repetição) colocada de forma distinta na célula [Yogev, Naamati, Pines 2011]. As ecoformas são proteínas idênticas, mesmo considerando que em alguns casos, eles tenham funções diferentes. No caso da fumarase, a ecoforma refere-se a uma situação em que uma das ecoformas é deslocada através da membrana mitocondrial, enquanto a outra ecoforma está num compartimento diferente. A fumarase citossólica pode participar no ciclo da ureia e metabolismo de amino ácidos [Ratner, Anslow, Petrack 1953].

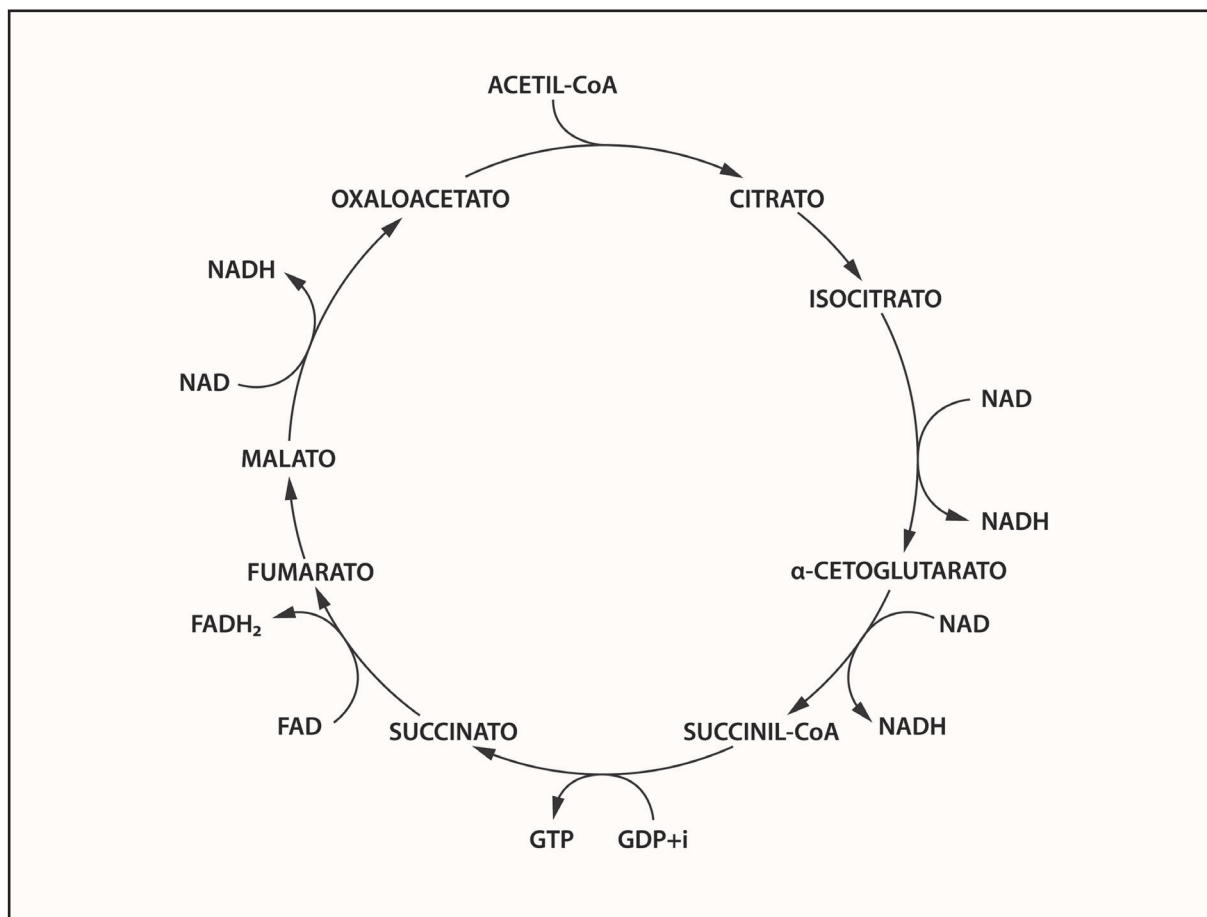
Reação Catalisada pela Malato Desidrogenase

A reação final do ciclo de Krebs é catalisada pela enzima malato desidrogenase, que interconverte o malato e o oxaloacetato. O oxaloacetato é um intermediário do ciclo de Krebs, que desempenha um papel muito importante em muitas vias metabólicas. Ao lado de sua ação como metabolito intermediário do ciclo de Krebs, o oxaloacetato está envolvido na síntese de amino ácidos, na gliconeogênese, na manutenção do equilíbrio redox, nas trocas de metabolitos entre o citosol e organelas celulares. A interconversão de malato e oxaloacetato está acoplado ao processo de oxido-redução de coenzimas nucleotídicas (NAD/NADH)



A reação catalisada pela malato desidrogenase é endergônica, de modo, que o equilíbrio está deslocado no sentido de formação do malato e como resultado, a concentração de oxaloacetato que é formada é muito baixa, de modo, que para o ciclo continuar, há a necessidade de uma rápida remoção desse metabolito. Isso é alcançado pela reação seguinte, que é exergônica e a primeira do ciclo, que é catalisada pelo citrato sintase, em razão da ligação tio-éster da acetil-CoA, que é de alto potencial energético. Isso permite a formação de citrato, mesmo sendo baixa a concentração fisiológica de oxaloacetato, resultando no início de outro ciclo. Em eucariotes duas isoenzimas de malato desidrogenase são codificadas por genes nucleares e sintetizados no citoplasma, a isoforma citossólica (cMDH1) e a mitocondrial (mMDH2). Após a síntese a forma citossólica permanece, enquanto a isoforma mitocondrial é translocada para a matriz mitocondrial, facilitada por um sinal polipeptídico existente no N-terminal [Aziz, Chien et al., 1981; Hartmann, Gehring, Christen 1993; Lo, Liew et al., 2005]. O sítio ativo de malato desidrogenase consiste em um vacúolo hidrofóbico, que contém sítios de ligação para o substrato e cofator.

Figura 10.11 - As reações do ciclo de Krebs. 1-citrato sintase; 2-aconitase; 3 isocitrato desidrogenase; 4- α -cetoglutarato desidrogenase; 5-succinil-CoA sintetase; 6- succinato Desidrogenase; 7-Fumarase e 8- malato desidrogenase



O mRNA de malato desidrogenase citossólico (MDH1) é expresso em alto nível no coração e músculo, relativamente expresso alto no cérebro e baço e em níveis menores nos rins, intestino, fígado e testículo [Lo, Liew et al., 2005]. A malato desidrogenase é regulada alostericamente pelo citrato [McEvily, Mullinax et al., 1985; Gelpi, Dordal et al., 1992], inibida pelo ATP, ADP, fumarato e aspartate [Casado, Cortes, Bozal 1980; Oza, Shore 1973]. Até aqui, vimos as reações químicas catalisadas pelas respectivas enzimas, pertencentes ao ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo do ácido cítrico. Agora vejamos, como elas se relacionam. (Figura 10.11) acima.

Considerações Sobre o Metabolismo da Glicose

O metabolismo celular depende do grau de transporte de substâncias do fluido extracelular para o citoplasma, de modo, que qualquer modificação que possa ocorrer no transporte é acompanhada por alterações na atividade metabólica. Dessa forma a permeabilidade da célula, bem como das organelas celulares pode se constituir num fator limitante para o metabolismo. Vimos, que a maior parte das substâncias são transportadas para o interior das células ou de organelas via transportadores específicos. Dentro da célula, a glicose começa a ser metabolizada através da via glicolítica, que ocorre no citossol.

O processo glicolítico não requer oxigênio, logo é um processo anaeróbico. O piruvato formado na glicólise pode ser usado na fermentação láctica, com formação de ácido láctico, bem como na fermentação alcoólica, com formação de etanol. Em mamíferos, a glicose é o único combustível que o cérebro usa, sob condições de não jejum, e o único combustível que o eritrócito pode usar. Em eucariotes a glicólise ocorre no citosol, que pode ser dividida em três fases: na primeira fase, a glicose é convertida a frutose-1,6 bisfosfato, etapa em que ocorre dois processos de fosforilação e uma isomerização; a segunda fase envolve a clivagem da frutose-1,6-bisfosfato em duas moléculas de trioses fosfatos, e na terceira fase as trioses fosfatos são oxidados com a formação de ATP.

Nos organismos aeróbicos, o ciclo de Krebs é constituído por oito reações enzimáticas, gerando equivalentes reduzidos (NADH e FADH₂), que são os responsáveis pelo acionamento da cadeia de transporte de elétrons ou cadeia respiratória, onde ocorre a formação de ATP. O ciclo ocorre exclusivamente na matriz mitocondrial e se inicia pela condensação de oxaloacetato com acetil-CoA. A disponibilidade da energia dos alimentos para a célula, provém das vias catabólicas. A fim de executarem suas funções, a carga energética da célula deve ser mantida alta. Em 1968, Atkinson propôs o termo carga energética para definir o estado energético celular, uma estimativa quantitativa da energia celular. Este parâmetro é definido em termos matemáticos como a fração do sistema adenílico, que é composto pelo ATP;

$$\text{Carga Energética} = \frac{[\text{ATP}] + 0,5 [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

A carga energética pode ter valores que variam de 0 (todo AMP) a 1 (todo ATP). Atkinson mostrou que as vias catabólicas (as que geram ATP) são inibidas por uma carga energética alta, enquanto as vias anabólicas (as que consomem ATP) são estimuladas pela carga energética alta [Atkinson 1968]. Outro parâmetro alternativo a carga energética é o potencial de fosforilação, que é definido como:

$$\text{Potencial de Fosforilação} = \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}] [\text{Pi}]}$$

O potencial de fosforilação depende da concentração de fosfato e é relacionado a energia

livre armazenada disponível do ATP. A carga energética da célula exerce sua ação reguladora do metabolismo, regulando alostericamente as enzimas.

O ciclo de Krebs fornece intermediários, que são utilizados na síntese de glicose, de lipídeos e de amino ácidos. No entanto, existem muitos organismos anaeróbicos, que usam o reverso do ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos (rTCA), para produzir compostos a partir de CO₂ e H₂O [Wachterhauser 1990; Kang, Suzuki et al., 2021] O acionamento das reações de redução usando compostos de carbono e ciclo de Krebs reverso (rTCA) pode ocorrer enzimaticamente ou não enzimaticamente em ambas as direções, dependendo das condições ambientais [Muchowska, Varma et al., 2017; Keller, Kampjut et al., 2017]. Em bactéria verde sulfurada (1) o ciclo de Krebs reverso é ativo durante o crescimento autotrófico e mixotrófico; (2) o fluxo do piruvato para acetil-CoA é muito baixo e a acetil-CoA é sintetizada pelo ciclo de Krebs reverso [Tang, Blankenship 2010].

Por fim, não podemos deixar de mencionar relatos recentes mostrando a presença de enzimas do ciclo de Krebs mitocondrial dentro do núcleo, indicando sua essencialidade para a remodelação epigenética e pluripotência [Nagaraj, Sharpley et al., 2017; Li, Long et al., 2022]. Isso, nos leva a raciocinar se a presença do ciclo de Krebs no núcleo exerce as mesmas funções, que na mitocôndria ou se exercem funções diferentes.

BIBLIOGRAFIA GERAL

Devlin TM (editor). *Biochemistry wit Clinical Correlations*. 7th edition. John Wiley & Sons, Inc Roboken, NJ. 2011

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (editors). *Biochemistry 5th edition* W.H. Freeman and Company, NY. 2002

Voet D, Voet JG (editors) *Biochemistry 2th edition*. John Wiley & Sons, Inc, NY 1995

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA

Aaronson RP, Frieden C 1972. Rabbit muscle phosphofructokinase: studies on the isomerization. The behavior of the enzyme at pH 8, pH 6 and intermediate pH values. *J Biol Chem* 247:7502-9.

Akram M 2014. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys* 68: 475-8.

Aleman S, Tung HY, Shenolikar S, Pilgis SJ, Cohen P 1984. The protein phosphatases involved in cellular regulation. Antibody to protein phosphatase-2A as a probe of phosphatase structure and function. *Eur J Biochem* 145: 51-6.

Aljahdali AS, Musaev FN, Burgner JW et al., 2022. Molecular insight into 2-phosphoglycolate activation of the phosphatase activity of bisphosphoglycerate mutase. *Acta Crystal D78*: 472-821-6.

Aragon JJ, Sols A 1991. Regulation of enzyme activity in the cell. Effect of enzyme concentration. *FASEB J* 5: 2945-50.

Arion WJ, Wallin BK 1973. Kinetics of the glucose-6-phosphate-glucose exchange activity and

glucose inhibition of glucose-6-phosphatase of intact and disrupted rat liver microsomes. *J Biol Chem* 248: 2372-9.

Atkinson DE 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interactions with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030-4.

Atsumi T, Chesney J, Metz C et al., 2002. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFKFB-3) in human cancers. *Cancer Res* 62: 5881-7.

Atsumi T, Nishio T, Niwa T et al., 2005. Expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB-3) isoform and adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. *Diabetes* 54: 3349-57.

Aziz LE, Chien SM, Patel HV, Freeman KB 1981. A putative precursor of rat liver mitochondrial malate dehydrogenase. *FEBS Lett* 133: 127-9.

Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V 2004. In self defence: hexokinase promotes voltage dependent anion channel closure and prevents mitochondria mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 377: 347-55.

Baek YH, Nowak T 1982. Kinetic evidence for a dual cation role for muscle pyruvate kinase. *Arch Biochem Biophys* 217: 491-7.

Banks RD, Blake CC, Evans PR et al., 1979. Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-binding enzyme. *Nature* 279: 773-7.

Barbetti F, Rocchi M, Bossolasco M et al., 1996. The human skeletal muscle glycogenin gene: cDNA, tissue expression and chromosomal localization. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 72-7.

Barnett JA 2003. A history of research on yeasts 6: the main respiratory pathway. *Yeasts* 20: 1015-44.

Beaufay H, Hers HG, Berthet J, de Duve C 1954. Le systeme hexose-phosphatasique. V. Influence de divers agents sur l'activite et stabilite de la glucosa-6-phosphatase. *Bull Soc Chimie Biol* 36: 1539-50.

Bedoya FJ, Wilson JM, Ghosh AK, Finegold D, Matschinsky FM 1986. The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue. *Diabetes* 35: 61-7.

Bergaggio E, Piva RJ 2019. Wild type IDH enzymes as actionable targets for cancer therapy. *Cancers* 11: 563 doi 10.3390.

Blake CC, Rice DW 1981. Phosphoglycerate kinase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 293: 93-104.

Bock PE, Frieden C 1976. Phosphofructokinase:I. Mechanism of the pH-dependent and reactivation of the rabbit muscle enzyme. *J Biol Chem* 251: 5630-6.

Bourne Y, Henrissat B 2001. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol* 11: 593-600.

- Brewer JM 1985. Specificity and mechanism of action of metal ions in yeast enolase. *FEBS Lett* 182: 8-14.
- Brewer JM, Ellis PD 1983 ³¹P NMR studies of the effect of various metals on substrate binding to yeast enolase. *J Inorg Biochem* 18: 71-82.
- Bridger WA 1971. Evidence for two types of subunits in succinyl-CoA synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 42: 948-54.
- Brodie AF, Li P, Mann F 1955. Identification of a gluconolactonase. *J Biol Chem* 212: 677-85.
- Brow KS, Kalinowski SS, Megill JR et al., 1997. Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* 46: 179-86.
- Browner MF, Nakano K, Bang AG, Fletterick RJ 1989. Human muscle glycogen synthase cDNA sequence: a negatively charged protein with an asymmetric charge distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1443-7.
- Bruns GA, Gerald PS 1976. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in man-rodent somatic cells hybrids. *Science* 192: 54-60.
- Cao Y, Mahrenholz AM, DePaoli-Roach AA, Roach PJ 1993. Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function. *J Biol Chem* 268: 14687-93.
- Cappel DA, Dejas S, Duarte JAC et al., 2019. Pyruvate carboxylase mediated anaplerosis promotes antioxidant capacity by sustaining TCA cycle and redox metabolism in liver. *Cell Metab* 29: 1291-305.
- Cardenas JM, Dyson RD 1978. Mammalian pyruvate kinase hybrid isozymes: tissue distribution and physiological significance. *J Exp Zool* 204: 361-7.
- Cardenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T 1998. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* 1401: 242-62.
- Casado FA, Cortes A, Bozal J 1980. Extraction and kinetic characteristics of chicken liver mitochondrial malate dehydrogenase. *Int J Biochem* 11: 437-47.
- Castro L, Tortora V, Mansilla S, Radi R 2019. Aconitase: non redox sulfur proteins sensitive to reactive species. *ACC Chem Res* 52: 2609-19.
- Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M 2002. Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays* 24: 371-81.
- Chatelain F, Pegorier JP, Minassian C et al., 1998. Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver intestine and kidney: in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes* 47: 882-9.
- Chesney J, Mitchell R, Benigni F et al., 1999. An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3947-52.

Cohen P, Rosemeyer MA, 1969. Subunit interaction of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Eur J Biochem* 8: 8-15.

Cohen PF, Colman RF, 1972. Diphosphopyridine nucleotide dependent isocitrate dehydrogenase from pig heart. Characterization of the active substrate and modes of regulation. *Biochemistry* 11: 1501-8.

Colombini M, Blachley-Dyson A, Forte M 1996 VDAC a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels* 4:169-202. Metabolism in humans. *Am J Physiol* 259: E677-84.

Colombo G, Lardy HA 1981. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine-5'-triphosphate) from rat liver cytosol. Divalent cation involvement in the decarboxylation reaction. *Biochemistry* 20: 2758-67.

Consoli A, Nurjhan N, Reilly JJ, Bier DM, Gerich JC 1990. Contribution of liver and skeletal muscle to alanine and lactate metabolism in humans. *Am J Physiol* 259: E677-84.

Consoli A, Nurjhan N, Reilly JJ, Bier DM, Gerich JE 1990. Mechanism of increased gluconeogenesis in non-insulin dependent diabetes mellitus: role of alteration in systemic hepatic and muscle lactate and alaline metabolism. *J Clin Invest* 86: 2038-45.

Cordes T, Michelucci A, Hiller K 2015. Itaconic acid: the surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite. *Annu Rev Nutr* 35: 451-73.

Cordes T, Wallace M, Michelucci A et al., 2016. Immuneresponsive gene-1 and itaconate inhibits succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate level. *JBC* 291: 14274-54

Cori CF 1983. Embden and the glycolytic pathway. *Trends Biochem Sci* 8: 257-9.

Curtino JA, Aon MA 2019. From the seminal discovery of proteoglycogen and glycogenin to emerging knowledge and research on glycogen biology. *Biochem J* 476: 3109-24.

Daniels BP, Kofman SB, Smith JR et al., 2019. The nucleotide sensor ZBP-1, and kinase RIPK3 induce the enzyme IRG-1 to promote an antiviral metabolic rate in neurons. *Immunity* 50: 64-76 e.4.

Degrandi D, Hoffman R, Beuter-Gunia C, Pfeifer K 2009. The proinflammatory cytokine induced IRG-1 protein associates with mitochondria. *J Interferon Cytok* 29: 55-7.

Dipple KM, Zhang YH, Huang BL et al., 2001. Glycerol kinase deficiency: evidence for complexity in a single gene disorders. *Huma Genet* 109: 55-62.

Duchen M 1992. Ca(2+) dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociate mouse sensory neurons. *Biochem J* 283: 41-50.

Duckworth HW, Nguyen NT, Gao Y et al., 2013. Enzyme substrate complexes of allosteric citrate synthase. Evidence for a novel intermediate in substrate binding. *Biochim Biophys Acta* 1834: 2546-53.

Dunaway GA, Kasten TP, Sebo T, Trapp R 1988. Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem J* 251: 677-83.

El-Maghrabi MR, Claus TH, Pilkis J, Pilkis SJ 1982. Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase activity by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 315-9.

Erlich RS, Colman RF 1981. Binding of ligands to half of subunits of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase from pig heart. Binding of manganous ion isocitrate and NAD. *J Biol Chem* 256: 1276-82.

Faller LD, Baroudy BM, Johnson AM, Ewall RX 1977. Magnesium ion requirements for yeast enolase reactivity. *Biochemistry* 16: 3864-9.

Fatima T, Rani S, Ficher S, Efferth T, Kiani FA 2018. The hydrolysis of 6-phosphogluconolactonase in the second step of pentose phosphate pathway occurs via a two water mechanism. *Biophys Chem* 240: 98-106.

Felig P, Pozefsky T, Marliss GF 1970. Alanine: key role in gluconeogenesis. *Science* 167: 1003-4.

Felipe-Barros L, Ruminot I, San Martin A et al., 2021. Aerobic glycolysis in the brain: Warburg and Crabtree contra Pasteur. *Neurochem Res* 46: 15-22.

Fletcher RJ, Madsen NB 1980. The structures and related function of phosphorylase a. *Annu Rev Biochem* 49: 31-61.

Gaenssle ALO, Bax HHM, van-der-Maarel MJEC, Jurak E 2021. GH13 glycogen branching enzymes can adapt the substrate chain length towards their preferences via α -1,4 transglycosylation. *Enz Microbial Technol* 150: 10.06/jenszmictec 2021.109882.

Geisbrecht BV, Goud SJ 1999. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 274: 30527-33.

Gelpi JL, Dordal A, Montserrat J, Cortes A 1992. Kinetics studies of the regulation of mitochondrial malate dehydrogenase by citrate. *Biochem J* 283: 289-97

Ghezi D, Goffrini P, Uziel G et al., 2009. SDAF1 encoding a LYR complex II specific assembly factor, is mutated in SDH defective infantile leukoencephalopathy.

Gonzalez C, Ureta T, Sanchez R, Niemeyer H 1964. Multiple molecular forms of ATP: hexose-6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 16: 347-52.

Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB 2004. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 22: 245-52.

Gottsmann I, Mandarino L, Gerich J 1983. Estimation and kinetic analysis of insulin independent glucose uptake in human subjects. *Am J Physiol* 244: E 632-5.

Grahan TE 2009. Glycogen: an overview of possible regulatory roles of the proteins associated with the granule. *Appl Physiol Nutr Metab* 34: 488-92.

Grant CM, Quin KA, Dawes IW 1999. Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozyme influences sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 19: 2650-6.

Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB 2014. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci* 71: 2577-604.

Green T, Grigorian A, Klyuyeva A et al., 2008. Structural and functional insights into the molecular mechanisms responsible for the regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 2. *J Biol Chem* 283: 15789-98.

Gudi R, Bowker-Kinley MM, Kedishvili NY, Zhao Y, Popov RM 1995. Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in human. *J Biol Chem* 270: 28989-94.

Gupta RK, Oesterling RM 1976. Dual divalent cation requirement for activation of pyruvate kinase: essential roles of both enzyme and nucleotide-bound metal ions. *Biochemistry* 15: 2881-7.

Hagerhall C 1997. Succinate:quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta* 1320:107-41.

Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M et al., 2005. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase is mutated in paraganglioma. *Science* 325: 1139-42.

Hartmann CM, Gehring H, Christen P 1993. The mature form of imported mitochondrial proteins undergoes conformational changes upon binding to isolated mitochondria. *Eur J Biochem* 218: 905-10.

Hers HG, de Duve C 1950. Le systeme hexose phosphatasique. II. Repartition de l'activite glucose-6-phosphatasique dans les tissus. *Bull Soc Chimie Biol* 32: 20-9.

Hesterberg LK, Lee JC 1982. Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of ligands *Biochemistry* 21: 216-22.

Hilf R, Ickowicz R, Bartley JC, Abraham S 1975. Multiple molecular forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal, preneoplastic and neoplastic mammary tissue of mice *Cancer Res* 35: 2109-16.

Hofman S, Pette D 1994. Low-frequency stimulation of rat fasttwitch muscle enhances the expression of hexokinase II and both the translocation and expression of glucose transporter 4 (GLUT-4). *Eur J Biochem* 219: 307-15.

Hoofman A O'Neill LAJ 2019. The immune-modulatory potential of the metabolite itaconate. *Trends Immunol* 40: 687-98.

Horecker BL 2002. The pentose phosphate pathway. *J Biol Chem* 277: 47966-71.

Huang S, Millar AH 2013. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr Opin Plant Biol* 16: 344-9.

Huang YM, Huber GA, Wang N, Minter SD, McCammon JA 2017. Brownian dynamic study of an enzyme metabolon in the TCA cycle: substrate kinetics and Channeling. *Prot Sci* 27: 463-71.

Hudson JW, Hefferon KL, Crerar MM 1993. Comparative analysis of species independent, isozyme specific acid substitutions in mammalian muscle, brain and liver glycogen phosphorylase. *Biochem Biophys Acta* 1164: 197-208.

Hudson JW, Golding GB, Crerar MM 1993. Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J Mol Biol* 234: 700-21.

Hue L, Beauloye C, Marsin AS et al., 2002. Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1091-7.

Iacobazzi V, Infantino V 2014. Citrate-new function for an old metabolite. *Biochem Chem* 395: 387-99.

Iglesia N, Mukhatar M, Seoane J, Guinovart JJ, Agius L 2000. The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J Biol Chem* 275: 1597-603.

Imamura K, Tanaka T 1972. Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissuesI. Electrophoretic studies. *J Biochem* 71: 1043-51.

Israelsen WJ, Vander-Heiden MG 2015. Pyruvate kinase: function, regulation and role in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 43:43-51.

Iynedjian PB 1993. Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* 273: 1-13.'

Iynedjian PB 2009. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* 66: 27-42.

Jenssen T, Nurjhan N, Consoli A, Gerich JE 1990. Failure of substrate-induced gluconeogenesis to humans : demonstration of hepatic autoregulation without a change in plasma glucose concentration. *J Clin Invest* 86: 489-97.

Jetton TL, Liang Y, Pettepher CC et al., 1994. Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem* 269: 3641-54.

Jiang X, Zhang P, Li S et al., 2016. Molecular size dependence of glycogen enzymatic degradation and its importance for diabetes. *Eur Polym* 82: 175-80.

Jo HJ, Park S, Jeong HG, Kim JW, Park jt 2015. *Vibrio vulnificus* glycogen branching enzyme preferentially transfers very short chains: N1 domain determines the chain length transferred. *FEBS Lett* 589: 1089-94.

Johansen T, Lamark I, 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter protein. *Autophagy* 7: 279-96.

Johnson LN 1992. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J* 6: 2274-82.

Johnson LN, Lewis RJ 2001. Structural basis for control of phosphorylation. *Chem Rev* 101: 2209-42.

Kalamidas SA, Kotoulas OB, Kotoulas AO, Maintas DB 1994. The breakdown of glycogen in the lysosomes of newborn rat hepatocytes: the effects of glucose cyclic 3', 5' AMP and caffeine. *Hist Histopathol* 9: 691-8.

Kalamidas SA, Kondomerkos DJ 2010. The administration of non metabolizable glucose analogues fails to suppress the development of autophagy in newborn rat hepatocytes. *Microsc Res Technol* 73: 1009-14.

Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y 2004. Structural basis for allosteric regulation of monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12: 429-38.

Kaminski MT, Schultz J, Waterstradt R et al., Glucose induced dissociation of glucokinase from the regulatory protein in the nucleus of hepatocytes prior to nuclear export. *Biochim Biophys Acta* 1843: 554-64.

Kang L, Dunn-Meynell AA, Routh VH et al., 2006. Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes* 55: 412-20.

Kang HJ, Jung SK, Kim SJ, Chung SJ 2008. Structure of human alpha enolase (hENO-1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64: 551-7.

Kasvinsky PJ, Shechosky S, Fletterick RJ 1978. Synergistic regulation of the phosphorylase a by glucose and caffeine. *J Biol Chem* 253: 9102-6.

Kasvinsky PJ, Fletterick RJ, Madsen NB 1981. Regulation of the dephosphorylation of glycogen phosphorylase a and synthase b by glucose and caffeine in isolated hepatocytes . *Can J Biochem* 59: 387-95.

Katzen HM, Schimke RT 1965. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution age dependency and properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 1218-25.

Kaur R, Dahiya L, Kumar M 2017. Fructose-1,6-bisphosphatase inhibitors: a new valid approach for management of type 2 diabetes mellitus. *Eur J Med Chem* 141: 473-505.

Keller MA, Kampjut D, Harrison SA, Ralser M 2017. Sulfate radicals enable a non-enzymatic Krebs cycle precursor. *Nat Ecol Evol* 1: 83 doi 10.1038/s 41559-017-0083.

Khan A, Hong-Lie C, Landau BR 1995. Glucose-6-phosphatase activity in islets from ob/ob and lean mice and the effect of dexamethasone. *Endocrinol* 136: 1934-8.

Kim HJ, Jeong MY, Na U, Winge DR 2012. Flavinylation and assembly of succinate dehydrogenase are dependent on the C-terminal tail of the flavoprotein subunit. *J Biol Chem* 287:40670-9.

Kirkman BR, Whelan WJ, Bailey JM 1989. The distribution of glucosamine in mammalian glycogen from different species, organs and tissues. *Biofactors* 2: 123-6.

Kirkman BR, Whelan WJ 1986. Glucosamine is a normal component of liver glycogen. *FEBS Lett* 194: 6-11.

Kochetov GA, Solovjeva ON 2014. Structure and functioning mechanism of transketolase. *Biochim Biophys Acta* 1844: 1608-18.

Kondomerkos DJ, Kalamidas SA, Kotoulas OB 2004. Na electron microscopic and biochemical study of the effects of glucagon on glycogen autophagy in the liver and heart of newborn rats. *Microsc Res Technol* 63: 87-93.

Kondomerkos DJ, Kalamidas SA, Kotoulas OB, Hann AC 2005. Glycogen autophagy in liver and heart of newborn rats. The effects of glucagon, adrenalin or rapamycin. *Hist Histopathol* 20: 689-96.

Kornberg HI 1987. Krebs citric acid cycle: half a century and still turning introductory. *Biochem Soc Symp* 54: 1-2.

Kotara M, Gover S, Vandeputte-Ruten L et al., 2005. Structural studies of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D* 61: 495-504.

Kotoulas OB, Kalamidas SA, Miles P, Hann AC 2003. An electron microscopic and biochemical study of the effects of propranolol on glycogen autophagy in newborn rat hepatocytes. *Hist Histopathol* 18: 811-8.

outsefeli P, Varma U, Daniels LJ et al., 2022. Glycogen autophagy: molecular machinery and cellular mechanisms of glycophyagy. *J Biol Chem* 298: 102093.

Krebs HA, Johnson WA 1937. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissue. *Enzymologia* 4: 148-56.

Kropp ES, Wilson JE 1970. Hexokinase binding sites on mitochondrial membranes. *Biochem Biophys Res Commu* 38: 74-9.

Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouska M et al., 2016. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab* 24: 158-66.

Larion M, Miller BG 2012. Homotropic allosteric regulation in monomeric mammalian glucokinase. *Arch Biochem Biophys* 519: 103-11.

Larsen TM, Benning MM, Rayment I, Reed GH 1998. Structure of the bis (Mg-ADP) oxalate complex of the rabbit muscle pyruvate kinase at 2-1 Å resolution: ATP binding over a barrel. *Biochemistry* 37: 6247-55.

Lauritzen HPMM, Schertzer JD 2010. Measuring GLUT-4 translocation in mature muscle fibers. *AM J Physiol Endocr Metab* 299: E 169-79.

Legendre F, MacClean A, Appanna VP, Appana VD 2020. Biochemical pathways to α -keto glutarate, a multifaceted metabolite. *World J Microbiol Biotechnol* 36: 123 doi.org 10.1007/s 11274-020-02900-8.

Lemire BL, Oyedotun KS 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate: ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 1553:102-6.

Lenzen S 2014. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *J Biol Chem* 289: 12189-94.

Li W, Long Q, Wu H et al., 2022. Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes modulates pluripotency via histone acetylation. *Nat Commun* 13: 7414 doi 10.1038/s 41467-022-35199.

Liao ST, Han C, Xu DQ et al., 2019. 4-octyl itaconate inhibits aerobic glycolysis by targeting GAPDH to exert anti-inflammatory effects. *Nat Commun* 10: 5091 doi 10.1038/s41467-019-13078-5.

Lin G, Brownsey RW, MacLeod KM 2009. Regulation of mitochondrial aconitase by phosphorylation in diabetic rat heart. *Cell Mol Life Sci* 66: 919-32.

Lin A, Mu J, Yang J, Roach PJ 1999. Self glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an intersubunit reaction. *Arch Biochem Biophys* 363: 163-70.

Lo ASY, Liew CT, Ngai SM et al., 2005. Developmental regulation and cellular distribution of human cytosolic malate dehydrogenase (MDH1). *J Cell Biochem* 94: 763-73.

Lomako J, Lomako WM, Kirkman BR, Whelan WJ 1994. The role of phosphate in muscle glycogen. *Biofactors* 4: 167-71.

Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ, Marchase RB 1993. Glycogen contains phosphodiester groups that can be introduced by UDP-glucose: glycogen glucose-1-phosphotransferase. *FEBS Lett* 329: 263-7.

Lloyd DJ, St Jean DJ Jr, Kurzeja RJ et al., 2013. Antidiabetic effects of glucokinase regulatory protein small molecule disruptor. *Nature* 504: 437-40.

Luther MA, Cai GZ, Lee JC 1986. Thermodynamics of dimer and tetramer formation in rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochemistry* 25:7931-7.

Mailloux RJ, Singh R, Brewer G et al., 2009 α -ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant α -ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 191: 3814-10.

Mandell DJ, Chorny I, Groban ES et al., 2007. Strengths of hydrogen bonds involving phosphorylated amino acid side chain. *J Am Chem Soc* 129: 820-7.

Mannela CA 1998. Conformational changes in the mitochondrial channel protein VDAC and their functional implications. *J Struct Biol* 121: 207- 18.

Marangos PJ, Zisa P, Clark RL, Goodwin FK 1978. Neuronal, non-neuronal and hybrid of enolase in brain: structural immunological and functional comparisons. *Brain Res* 150: 117-33.

Martin DB, Vagelos PR 1962. The mechanism of tricarboxylic acid cycle regulation of fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 237: 1787-92.

Massa ML, Gagliardino JJ, Francini F 2011. Liver glucokinase: an overview on the regulatory mechanisms of its activity. *IUBMB Life* 63: 1-6.

- Matasova LV, Popova TN 2008. Aconitate hydratase of mammals under oxidative stress. *Biochemistry* 73: 957-64.
- Matschinski FM, Ellerman JE 1968. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J Biol Chem* 243: 2730-6.
- Matschinski FM, Magnuson MA, Zellent D et al., 2006. The network of glucokinase expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55: 1-12.
- Matschinsky FM 2009. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8: 399-416
- Matschinski FM, Wilson DF 2019. The central role of glucokinase in glucose homeostasis: a perspective 50 years after demonstrating the presence of the enzyme in islets of Langerhans. *Front Physiol* 10: 148 doi 10.3389/fphys.2019.00148.
- Mazurek S, Grimm H, Boscher CB, Vaupel P, Eigenbrodt E 2002. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolism. *Br J Nutr* 87 (Supl 1): 523-9.
- McCarrey JR, Thomas K 1987. Human testis-specific PGK gene lack introns and possesses characteristics of processed gene. *Nature* 326: 501-5.
- McEvily AJ, Mullinax TR, Dulin DR, Harrison JH 1985. Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase: kinetic modulation independent of subunit interaction. *Arch Biochem Biophys* 238: 229-36.
- McLain A, Szweda PA, Szweda PI 2011. α -Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor. *Free Radic Res* 45: 29-36.
- Michelucci A, Cordes T, Ghefi J et al., 2013. Immune-responsive gene-1 protein links metabolism with immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 7820-5.
- Mills EL, Ryan DG, Prag HA et al., 2018. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf via alkylation of KEAP-1. *Nature* 556: 113-7.
- Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I et al., 2002. Hypoxia inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB-3) gene. Its possible role in the Waeburg effect. *J Biol Chem* 277: 6183-7.
- Mu J, Roach PJ 1998. Characterization of human glycogenin-2, a self glucosylating initiator of liver glycogen metabolism. *J Biol Chem* 273: 34850-6.
- Muchowska KB, Varma SJ, Chevallot-Beroux E et al., 2017; Metals promote sequences of the reverse Krebs cycle. *Nat Ecol Evol* 1: 1716-21.
- Muirhead H, Clayden DA, Barford D et al., 1986. The structure of cat muscle pyruvate kinase. *EMBO J* 5: 475-81.
- Nagaraj R, Sharpley MS, Chi F et al., 2017. Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes as a critical step in mammalian zygotic genome activation. *Cell* 168: 210-23.

- Nekrutenko A, Hillis DM, Patton JC, Bradley RD, Baker RJ 1998. Cytosolic isocitrate dehydrogenase in human, mice and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family. *Mol Biol Evol* 15: 1674-84.
- Newgard CB, Hwang PK, Fletterick RJ 1989. The family of glycogen phosphorylase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 24: 69-99.
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S 2003. Mitochondria releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481-90.
- Nicolau J, Bacila M 1969. N-acylsarcosines as inhibitors of respiration and glycolysis and glycolytic enzymes. *Arch Biochem Biophys* 129: 357-61.
- Nishi H, Shaytan A, Panchenko AR 2014. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Front Genet* 5: art. 270.
- Nuttal FQ, Ganon MC, Bai G, Lee EY 1994. Primary structure of human liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. *Arch Biochem Biophys* 311: 443-9.
- Ockerman PA 1965. Glucose-6-phosphatase in human jejunal mucosa: properties demonstrating the specific character of the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 105: 22-33.
- Odievre MH, Chretien D, Munnich A 2005. A novel mutation in dihydrolipoamide dehydrogenase E3 subunit gene (DLD) resulting in an atypical form of alpha keto glutarate dehydrogenase deficiency. *Hum Mutat* 25: 323-4.
- Okar DA, Lange AJ 1999. Fructose-2,6-bisphosphate and the control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors* 10: 1-14.
- Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ 2001. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trns Biochem Sci* 26: 30-5.
- Olagnier D, Brandtoft AM, Gunderstofte C et al., 2018. Nrf-2 negatively regulates STING indicating a link between antiviral sensing and metabolic reprogramming. *Nat Commun* 9: 3506 doi 10.1038/s 41467-018-05861-7.
- Ovádi J, Srere PA 2000. Macromolecular compartmentation and channeling. *Int Rev Cytol* 192: 255-80.
- Oza NB, Shore JD 1973. The effects of adenine dinucleotides on NADH-binding mitochondria malate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 154: 360-5.
- Paetkau V, Lardy HA 1967. Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties. *J Biol Chem* 242: 3035-42.
- Palmieri F 2004. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447: 689-709.
- Pancholi V 2001. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *CMLS Cell Mol Life Sci* 58: 902-20.

- Pang H, Koda Y, Kimura H 2002. Identification of human phosphoglucomutase 3 (PGM3) as N-acetyl-glucosamine-phosphate mutase (AGM1). *Ann Hum Genet* 66 (Pt 2): 139-44.
- Patel MS, Korotchkina LG, Sidhu S 2009. Interaction of E1 and E3 components with the core proteins of the human pyruvate dehydrogenase complex. *J Mol Catal B* 61: 2-6.
- Park J, Rho HK, Kim KH et al., 2005. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol Cell Biol* 25: 5146-57.
- Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT 2004. Carbonic anhydrases: current state of art, therapeutic applications and future prospects. *J Enz Inhibit Med Chem* 19: 199-229.
- Patra KC, Hay N 2014. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trend Biochem Sci* 39: 347-54.
- Pautsch A, Stadler N, Lohle A et al., 2013. Crystal structure of glucokinase regulatory protein. *Biochemistry* 414: 1-18.
- Pavelich MJ, Hammes GG 1973. Aggregation of rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochemistry* 12: 1408-14.
- Peace CG, O'Neill LAJ 2022. The role of itaconate in host defence and inflammation. *J Clin Invest* 132: e148548.
- Perham RN 1991. Domains, motifs and linkers in 2 oxoacid dehydrogenase multienzymes complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry* 30: 8501-12.
- Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, McGrane M et al., 1982. Fructose-2,6-bisphosphate: mediator of hormone action at the fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate substrate cycle. *Mol Cell Endocrinol* 25:245-66.
- Pilkis SJ, Crisman TD, El-Maghrabi MR et al., 1983. The action of insulin on hepatic fructose-2,6-bisphosphate metabolism. *J Biol Chem* 258: 1495-503.
- Pitcher J, Smythe C, Cohen P 1988. Glycogenin is priming glucosyl transferase required for initiation of glycogen biogenesis in rabbit muscle. *Eur J Biochem* 176: 391-5.
- Pollak N, Dolle C, Ziegler RM 2007. The power to reduce: pyridine nucleotide small molecules with multitude of functions. *Biochem J* 402:205-18.
- Raimondo A, Rees MG, Gloyn AL 2015. Glucokinase regulatory protein: complexity at the crossroads of triglyceride and glucose metabolism. *Curr Opin Lipid* 26: 88-95.
- Ratner S, Anslow WP Jr, Petrack B 1953. Biosynthesis of urea. VI enzymatic cleavage of argininosuccinic acid to arginine and fumaric acid. *J Biol Chem* 204: 115-25.
- Ren F, Wu H, Lei Y et al., 2010. Quantitative proteomics identification of phosphoglycerate mutase-1 as a novel therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 9: 81. doi 10.1186/1476-4598-9-81.

- Ren Y, Li LI, Wan LI, Huang Y, Cao S 2022. Glucokinase as an emerging antidiabetes target and recent progress in the development of its agonists. *J Enz Inhibit Med Chem* 37: 606-15.
- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D et al., 2004. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 381: 561-79.
- Rigante C, Gazzano E, Polimeni M, Aldieri E, Ghigo D 2012. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defence and Crossroad in tumor cell fate. *Free Rad Biol Med* 53: 421-36.
- Roach PJ 1990. Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation. *FASEB J* 4: 2961-8.
- Roach PJ 1991. Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J Biol Chem* 266: 14139-42.
- Roach PJ, DePaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS 2012. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* 441: 763-87.
- Robey RB, Hay N 2006. Mitochondrial hexokinases: novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and AKT. *Oncogene* 25: 4683-96.
- Robinson JB, Srere PA 1985. Organization of Krebs cycle tricarboxylic acid cycle enzymes. *Biochem Med* 33: 149-57.
- Rodriguez A, de la Cera T, Herrero P, Moreno F 2001. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK-1, HXK-1 and HXK-2 genes of *saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 355: 625-31.
- Rodriguez IR, Whelan WJ 1985. A novel glycosyl-amino acid linkage: rabbit muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem Biophys Res Commun* 132: 829-36.
- Rose IA, Warms JVB 1967. Mitochondrial hexokinase: release, rebinding and location. *J Biol Chem* 242: 1635-45.
- Rose ZB, Whalen RG 1973. The phosphorylation of diphosphoglycerate mutase. *J Biol Chem* 248: 1513-9.
- Rose ZB, Dube S 1976. Rates of phosphorylation and dephosphorylation of phosphoglycerate mutase and bisphosphoglycerate synthase. *J Biol Chem* 251: 4817-22.
- Rowles J, Scherer SW, Xi T et al., 1996. Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *J Biol Chem* 271: 22376-82.
- Sakibara R, Kato M, Okamura T et al., 1997. Characterization of human placental fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biochem* 122: 122-8.
- Sarabu R, Taub R, Grimsby J 2007. Glucokinase activation-a-strategy for T2D therapy: recent developments. *Drug Discov Today* 4: 111-5.

- Schoffelen S, van Hest JCM 2012. Multi enzyme systems: bringing enzyme together in vitro. *Soft Matter* 8: 1736-46.
- Schuppe-Koistnen I, Moldeus P, Bergman T, Cotgreave IA 1994. S-thiolation of human endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase hydrogen peroxide treatment. *Eur J Biochem* 221: 1033-7.
- Seeholzer SH, Jaworowski A, Rose IA 1991. Enol pyruvate: chemical determination as a pyruvate kinase intermediate. *Biochemistry* 30: 727-32.
- Sharif F, Rasul A, Ashraf A et al., 2019. Phosphoglyceromutase in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* 71: 1418-27.
- Sirover MA 1999. New insights into an old protein. The functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *BBA in the diabetic kidney*.
- Skurat AV, Dietrich AD, Roach PJ 2006. Interaction between glycogenin and glycogen synthase. *Arch Biochem Biophys* 456: 93-7.
- Smith CH, Brown NE, Lamer J 1971. Molecular characteristics of the totally dependent and independent forms of glycogen synthase from rabbit muscle. II- Some chemical characteristic of the enzyme protein and its change or interconversion. *Biochem Biophys Acta* 242: 81-8.
- Smythe C, Caudwell FB, Ferguson M, Cohen P 1988. Isolation and structural analysis of a peptide containing the novel tyrosyl-glucose linkage in glycogen. *EMBO J* 7: 2681-6.
- Solovjeva ON, 2023. New role of water in transketolase catalysis. *Int J Mol Sci* 24: 2068 doi. org. 10.3390/ijms 24032068.
- Srere PA 1985. The metabolon. *Trends Biochem Sci* 10: 109-10.
- Stammer DK, Muirhead H 1977. Three structure of cat muscle pyruvate kinase at 3-1 Å resolution. *J Mol Biol* 112: 309-16.
- Stanton RC 2012. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH and Cell survival. *IUBMB Life* 64:362-9.
- Stapleton D, Nelson C, Parsawar K et al., 2010. Analysis of hepatic glycogen-associated proteomics. *Proteomics* 10:2320-9.
- Strelko CL, Lu W, Dufort FJ et al., 2011. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc* 133: 16386-9.
- Sullivan MA, Nitschke S, Steup M, Minassian BA, Nitschke F 2017. Pathogenesis of Lafora disease: transition of soluble glycogen to insoluble polyglucosan. *Int J Mol Sci* 18: 1743 doi 10.3390/ijms 18081743.
- Sullivan MA, Forbes JM 2019. Glucose and glycogen in the diabetic kidney: heroes or villains. *eBiomedicine* 47: 590-7.

- Sullivan MA, Nitschke S, Skawara EP et al., 2019. Skeletal muscle glycogen chain length correlates with insolubility in mouse models of polyglucosan associated neurodegenerative diseases. *Cell rep* 27: 1334-44.e6.
- Sun F, Huo X, Zhai Y et al., 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121: 1043-57.
- Suzuki E, Suzuki R 2016. Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes. *Cell Mol Life Sci* 73: 2643-60
- Tang KH, Blankenship RE 2010. Both forward and reverse TCA cycle operate in green sulfur bacteria. *J Biol Chem* 46: 35848-54.
- Thomas JA, Poland B, Honzatko R 1995. Protein-sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys* 319: 1-9.
- Tomitsuka E, Kita K, Esumi H et al., 2009. Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunits. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 258-65.
- Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A 2011. The diverse function of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal* 23: 317-33].
- Tomasiak TM, Maklashina E, Cecchini G, Iverson TM 2008. A Threonine on the active site loop controls transition state formation in Escherichia coli respiratory complex II. *J Biol Chem* 283: 15460-8.
- Tsujino S, Shanske S, Sakoda S, Fenichel G, DiMauro S 1993. The molecular genetic basis of muscle phosphoglycerate mutase (PGAM) deficiency. *Am J Human Genet* 52: 472-7.
- Udoh US, Swain TM, Filiano AN 2015. Chronic ethanol consumption disrupts diurnal rhythms of hepatic glycogen metabolism in mice. *Am J Physiol Gastroint liver physiol* 308: G964-74.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM et al., 2015. Proteomics: tissue-based map of human proteome. *Science* 347: 1260419.
- Ureta T 1978. The role of isozymes in metabolism: a model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. *Curr Top Cell Regul* 13: 233-58.
- Van der Werve G, Lange A, Newgard C et al., 2000. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose-6-phosphatase system. *Eur J Biochem* 267: 1533-49.
- Xie GC, Wilson JE 1988. Rat brain hexokinase: the hydrophobic N-terminus of the mitochondrially bound enzyme is inserted in the lipid bilayer. *Arch Biochem Biophys* 267: 803-10.
- Xie G, Wilson JE 1990. Tetrameric structure of mitochondrially bound rat brain hexokinase. A crosslinking study. *Arch Biochem Biophys* 276: 285-93.
- Yen WC, Wu YH, Wu CC et al., 2020. Impaired inflammasome activation and bacterial clearance in G6PD deficiency due to defective NOX/p38, MAPK/AP-1 redox signaling. *Redox Biol* 28: 101363 doi 10.1016/j.redox 2019. 101363.

- Yogev O, Naamati A, Pines O 2011. Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *FEBS J* 278: 4230-42.
- Walden WE 2002. From bacteria to mitochondria: aconitase yields surprises. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4138-40.
- Walker DG, Rao S 1964. The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver. *Biochem J* 90: 360-8.
- Wallace JC, Jitrapakdee S, Chapman-Smith A 1998. Pyruvate carboxylase. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1-5.
- Wamelink MM, Struys EA, Jakobs C 2008. The biochemistry metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review *J Inherit Metab Dis* 31: 703-17.
- Wang Q, Donthi RV, Wang J et al., 2008. Cardiac phosphate-deficient 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase increases glycolysis, hypertrophy and myocyte resistance to hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H 2889-97].
- Waskiewicz DE, Hammes GG 1984. Elementary steps in the reaction mechanism of the alpha keto glutarate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*: kinetics of succinylation and desuccinylation. *Biochemistry* 23: 3136-43.
- Watson HC, Walker NP, Shaw PJ et al., 1982. Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase. *EMBO J* 1: 1635-40.
- Webb BA, Forouhar F, Szu FE et al., 2015. Structures of human phosphofructokinase-1 and atomic basis of cancer-associated mutations. *Nature* 523:111-4.
- Willard HF, Goss SJ, Holmes MT, Munroe DL 1985. Regional localization of the phosphoglycerate kinase gene and pseudo gene of the human X chromosome and assignment of related DNA sequence to chromosome 19. *Human Genet* 71: 38-43.
- Williams NC, O'Neill LAJ 2018. A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation. *Front Immunol* 9: 141 doi. 103389/Fimmu 2018. 00141.
- Wilson JE 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 206: 2049-57.
- Wilson JE 1997. An introduction of the enzymes of mammalian hexokinases types I-III. *Biochem Soc Trans* 25: 103-7.
- Wyn RM, Kato M, Chuang JL et al., 2008. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 structures reveal a metastable open conformation fostering robust core free basal activity. *J Biol Chem* 283: 25305-15.
- Zancan P, Marinho-Carvalho M, Faber-Barata J, Dellias JMM, Sola-Penna M 2008. ATP and fructose-2,6-bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its quaternary structure. *IUBMB Life* 60: 526-33.

Zeqiraj E, Sicheri F 2015. Getting a handle on glycogen synthase. Its interaction with glycogenin. *Mol Asp Med* 46: 63-9.

Zheng H, Filippova EV, Tkaczuk KL et al., 2012. Crystal structures of putative phosphoglycerate kinase from *B.anthraxis* and *C. jejuni*. *J Struct Funct Genom* 13: 15-26.