

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA**

Isadora de Castro Calaça

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE E ESTRUTURA DA
6-FOSFOFRUTO-1-CINASE MEDIADA POR COLESTEROL**

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando
a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Rio de Janeiro, 2012

Isadora de Castro Calaça

**Modulação da atividade e estrutura da 6-fosfofruto-1-cinase
mediada por colesterol**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Mauro Sola-Penna

Prof. Associado do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, UFRJ.

Co-orientadora: Mônica M. Marinho-Carvalho

Departamento de Fármacos , Faculdade de Farmácia, UFRJ

Rio de Janeiro, 2012

Calaça, Isadora de Castro

Modulação da atividade e estrutura da 6-fosfofruto-1-cinase
mediada por colesterol

64 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2012.

Orientadores: Mauro Sola-Penna (Faculdade de Farmácia) e
Mônica M. Marinho-Carvalho (Faculdade de Farmácia)

1. Colesterol. 2. 6-fosfofruto-1-cinase. 3. Glicólise.

I Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Isadora de Castro Calaça

Modulação da atividade e estrutura da 6-fosfofruto-1-cinase
mediada por colesterol

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando
a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Rio de Janeiro, 05 de Setembro de 2012

Banca Examinadora:

Prof. Mauro Sola-Penna
Prof. Associado do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, UFRJ
(Orientador)

Prof. Bruno Lourenço Diaz
Prof. Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof^a. Jennifer Lowe
Prof^a. Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof. Alexandre dos Santos Pyrrho
Prof. Associado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas,
Faculdade de Farmácia, UFRJ

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo – LabECoM – Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Mauro Sola Penna e co-orientação da Professora Mônica M. Marinho-Carvalho, com auxílios financeiros concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

RESUMO

A 6-fosfofruto-1-cinase (PFK) é a principal enzima de uma via do catabolismo de glicose, a glicólise. A PFK apresenta papel central na regulação de todo o fluxo glicolítico, conseqüentemente sua atividade é rigidamente controlada. A atividade da PFK é regulada por diversos metabólitos que são considerados importantes marcadores de estado metabólico da célula. Baseado no papel crítico da PFK na glicólise e tendo em vista a relação evidenciada entre a via glicolítica e a biossíntese de colesterol, este trabalho tem como objetivo principal avaliar os efeitos do colesterol sobre a atividade e estrutura da enzima. Os resultados mostram que o colesterol inibe a atividade da PFK de maneira dependente da concentração e do tempo de pré-incubação, sem alterar a afinidade da PFK por seus substratos, F6P e ATP. Outros resultados sugerem que a PFK é inibida pelo colesterol mesmo em condições ótimas, como pH básico, no qual a enzima está na sua forma tetramérica e apresenta atividade máxima. O colesterol é, ainda, capaz de potencializar a inativação da PFK promovida pela pré-incubação em temperatura elevada. Esses resultados sugerem que o colesterol modula negativamente a atividade da PFK sem promover mudanças no equilíbrio oligomérico da enzima. Apresentando-se, portanto, como um regulador da enzima e, possivelmente, um importante marcador de estado metabólico da célula. Acreditamos que elevados níveis de colesterol intracelular indicariam a necessidade de redução na taxa de glicólise evitando, com isso, a produção de acetil-CoA por essa via, o que é conseguido através da inibição da atividade da PFK.

Palavras-chave: Colesterol, 6-fosfofruto-1-cinase (PFK), Glicólise

ABSTRACT

6-phosphofructo-1-kinase (PFK) is the key enzyme of a pathway on glucose catabolism, glycolysis. PFK presents a central role in regulating glycolytic flux thus their activity is tightly controlled. PFK activity is regulated by several metabolites that are considered important cell metabolic state markers. Based on the critical role of PFK in glycolysis and in the relationship between glycolytic pathway and cholesterol biosynthesis, this study aims to assessing the effects of cholesterol on enzyme activity and structure. The results show that PFK activity is inhibited in a concentration and pre-incubation time dependent manner, without affecting PFK affinity by their substrates, ATP and F6P. Other results suggest that PFK is inhibited by cholesterol even in optimal conditions, such as basic pH, in which enzyme is in its tetrameric form and presents maximum activity. Cholesterol is also able to potentiate PFK1 inactivation promoted by high temperature. These results suggest that cholesterol modulates negatively PFK activity presenting as an enzyme regulator and possibly an important cell metabolic status marker. We believe that elevated levels of intracellular cholesterol indicate the need for reducing glycolysis rate avoiding acetyl-CoA production, which is achieved by inhibiting PFK activity.

Keywords: Cholesterol, 6-phosphofructo-1-kinase, Glycolysis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Materiais	33
3.2	Métodos	33
3.2.1	Purificação da Enzima	33
3.2.2	Dosagem de proteína	34
3.2.3	Síntese de ATP radioativo	34
3.2.4	Ensaio radiométrico para quantificação da atividade da PFK	35
3.2.5	Espectro de fluorescência intrínseca	35
3.3	Análise estatística	36
4	RESULTADOS	38
4.1	Efeitos da pré-incubação com colesterol sobre a atividade da PFK	39
4.2	Avaliação da afinidade da PFK pelos seus substratos na presença de colesterol	41
4.3	Avaliação da atividade da PFK na presença de colesterol em condições físicas variadas	44
4.4	Avaliação do efeito do colesterol na atividade da PFK na presença de diferentes moduladores alostéricos da enzima	46
4.5	Efeito do colesterol sobre a estrutura quaternária da PFK	48
4.6	Efeitos da pré-incubação com esteróis derivados do colesterol sobre a atividade da PFK	49
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	56
7	REFERÊNCIAS	58

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Andréa e Manuel, por todo o carinho, compreensão, dedicação e incentivo. Dedico esta e todas as minhas demais conquistas a vocês.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

À Deus, por acreditar que nossa existência pressupõe uma outra infinitamente superior.

Aos meus pais, por todo o carinho, compreensão, dedicação e incentivo.

Ao meu noivo, Alex, por ser acima de tudo meu grande amigo.

Às minhas irmãs, Michaeli e Ludmila, e afilhados, Maria Flor e Gustavo, por serem meu refúgio.

À minha madrinha, Thula, pelos inúmeros conselhos.

Aos meus familiares, por serem exemplo de união e honestidade.

Ao meu orientador, Prof. Mauro Sola-Penna, pela orientação desta dissertação.

À minha orientadora, Mônica M. M. C., orientadora na ciência e na vida.

Aos membros da Comissão de Acompanhamento, Prof. Alexandre Pyrrho e Prof^a. Patricia Zancan, pelas contribuições.

Aos membros da Banca, por terem aceitado ao convite.

Aos amigos do laboratório, Mônica, Daniel, Raquel, Jair, Priscila, Deborah, Lívia, Lilian, Thyago, Raíssa, João, Vanessa e Carol, pelos momentos incríveis que passamos juntos. Vocês foram parte fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional!

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Visão geral do metabolismo de carboidratos	19
Figura 2	Regulação do metabolismo de carboidratos mediada por AKT	21
Figura 3	Ligantes alostéricos fisiológicos da PFK1	25
Figura 4	Efeito do colesterol sobre a atividade da PFK1	29
Figura 5	Atividade da PFK após pré-incubação na presença de colesterol	40
Figura 6	Atividade da PFK após pré-incubação por 60 minutos na presença de concentrações variadas de colesterol	40
Figura 7	Efeito do colesterol sobre a atividade da PFK em diferentes concentrações de ATP	42
Figura 8	Efeito do colesterol sobre a atividade da PFK em diferentes concentrações de F6P	42
Figura 9	Efeito do colesterol na atividade da PFK em condições variadas de pH	44
Figura 10	Terminativação da PFK na presença de colesterol em função do tempo de pré-incubação	45
Figura 11	Efeito do colesterol sobre a atividade da PFK na presença de diferentes moduladores alostéricos da enzima	47
Figura 12	Efeito do colesterol sobre o centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da PFK	48
Figura 13	Estrutura molecular dos derivados de colesterol	49
Figura 14	Efeitos da pré-incubação com esteróis derivados do colesterol sobre a atividade da PFK purificada	50
Tabela I	Efeitos do colesterol sobre os parâmetros cinéticos da PFK purificada de músculo esquelético de coelho	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[³² P] Pi	Fosfato Inorgânico Marcado com Fosfato Radioativo
[γ- ³² P] ATP	Adenosina 5'trifosfato Marcado Radioativamente no Fosfato γ
ACAT	Acil-Coenzima A: Colesterol Aciltransferase
ACC	Acetil-CoA Carboxilase
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ACL	ATP:Citrato Liase
ADP	Adenosina 5'difosfato
AKT ou PKB	Proteína Cinase B
AMP	Adenosina 5'monofosfato
ATP	Adenosina 5'trifosfato
BCL2	Do inglês: <i>B-cell lymphoma 2</i> ; Célula B de Linfoma 2
BSA	Albumina de Soro Bovino
CETP	Proteína de Transferência de Éster de Colesterol
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
F1,6BP	Frutose 1,6-bifosfato
F1,6BPase	Frutose-1,6-Bifosfatase
F2,6BP	Frutose 2,6-bifosfato
F6P	Frutose- 6-fosfato
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzida
FAS	Ácido Graxo Sintase
FPP	Farnesil Pirofosfato
G3P	Gliceraldeído-3-Fosfato
G6P	Glicose-6-Fosfato
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GH	Do inglês: <i>Growth Hormone</i> ; Hormônio do Crescimento
GLUT	Transportador de Glicose
GPP	Geranil Pirofosfato
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	Do Inglês: <i>High-Density Lipoproteins</i> ; Lipoproteína de Alta Densidade
HK	Hexocinase
HMG-CoA	β-Hidroxi-β-Metilglutaril-CoA
I	Intensidade de Fluorescência
I _{0,5}	Constante de Afinidade para Inibição
IDL	Do Inglês: <i>Intermediate Density Lipoprotein</i> ; Lipoproteína de Densidade Intermediária
IGF	Do inglês: <i>Insulin-like growth factor</i> ; Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IPP	Isopentenil Pirofosfato
IRS	Do inglês: <i>Insulin Receptor Substrate</i> ; Substrato do Receptor de Insulina

$K_{0,5}$	Constante de Afinidade para Substrato
LCAT	Lecitina-Colesterol Acil Transferase
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Do Inglês: <i>Low-Density Lipoproteins</i> ; Lipoproteína de Baixa Densidade
NAD^+	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo Oxidada
NADH	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo Reduzida
NaF	Fluoreto de Sódio
n_i	Índice de Cooperatividade do Componente de Inibição
n_s	Índice de Cooperatividade do Componente de Estímulo
PDH	Piruvato Desidrogenase
PFK	6-Fosfofruto-1-Cinase
PFK2	6-Fosfofruto-2-Cinase
PFK-L	6-Fosfofruto-1-Cinase Isoforma L
PFK-M	6-Fosfofruto-1-Cinase Isoforma M
PFK-P	6-Fosfofruto-1-Cinase Isoforma P
Pi	Fosfato Inorgânico
PI3K	Fosfatidil Inositol 3-Cinase
PK	Piruvato Cinase
SREBP	Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta a Esterol
VLDL	Do Inglês: <i>Very-Low Density Lipoproteins</i> ; Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
V_{max}	Velocidade Máxima
$V_{max\ app}$	Velocidade Máxima Aparente

PREFÁCIO

Esta dissertação traz como ineditismo a possível (e muito provável) inibição da principal enzima regulatória da glicólise – fosfofrutocinase – pelo colesterol. Este último, por sua vez, embora culturalmente seja associado a gorduras, é um produto metabólico do catabolismo de glicose. Essa correlação vem do fato da síntese de colesterol, que ocorre a partir de um intermediário do catabolismo da glicose, ser ativada pelo hormônio que também estimula o catabolismo de glicose, a insulina. Apesar de todas as informações necessárias para essa correlação ser exaustivamente discutida em todos os livros-texto de bioquímica e fisiologia, a correlação em si é muitas vezes deixada em um segundo plano, perpetuando o conhecimento popular de que o colesterol em nosso organismo é proveniente da gordura que ingerimos. Nesse sentido, fizemos aqui a opção por uma introdução enxuta mas que atacasse diretamente os aspectos dessa correlação, chamando a atenção para o ponto central do presente trabalho: a inter-relação entre o colesterol e a regulação glicolítica.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O metabolismo celular de carboidratos é regulado através de sinais extra e intracelulares. Os sinais extracelulares são mediados por ação hormonal que envolvem, destacadamente, a ação da insulina. Um sem-número de outros hormônios regulam o metabolismo de carboidratos (e.g. glucagon, adrenalina, GH, IGF, cortisol, serotonina, hormônios sexuais e etc) mas não serão discutidos no presente trabalho. Proteínas sinalizadoras intracelulares traduzem os sinais hormonais regulando e integrando inúmeras vias metabólicas. Os sinais intracelulares, independentes da ação hormonal, envolvem o estado energético da célula, proliferação celular e estresse (MULUKUTLA et al., 2010).

A insulina é produzida e secretada pelas células β do pâncreas endócrino em resposta a um aumento de glicose pós-prandial. A ligação da insulina à subunidade α do domínio extracelular do receptor de insulina (RI) inicia uma cascata de sinalização que permite mudanças adaptativas na expressão de mais de 100 genes que regulam processos metabólicos. Além disso, promove a regulação de diversas enzimas relacionadas a diferentes vias metabólicas e, em músculo esquelético e tecido adiposo, a translocação do transportador de glicose específico desses tecidos, GLUT-4, do citosol para a membrana plasmática, permitindo a entrada de glicose nestas células (JORNAYVAZ, SAMUEL E SHULMAN, 2010; TATON, CZECH E PIATKIEWICZ, 2010). O RI apresenta atividade tirosina cinase, tendo como substrato o próprio RI, além de uma família de mediadores de sinalização intracelular denominada IRS, do inglês, *insulin receptor substrate* (substrato do receptor de insulina). A ligação da insulina à subunidade α do domínio extra-celular do RI induz uma mudança conformacional resultando na auto-fosforilação do receptor. O receptor fosforilado tem sua atividade tirosina cinase aumentada, levando a uma maior fosforilação de IRS. Este, por sua vez, ativa fosfatidil inositol 3-cinase (PI3K), que fosforila fosfatidil inositol 4,5-bifosfato em fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato que atua como segundo mensageiro levando a ativação de AKT (ou proteína cinase B) (JORNAYVAZ, SAMUEL E SHULMAN, 2010). Além de estar envolvida na translocação de GLUT-4 do citoplasma para a membrana, a

fosforilação de AKT exerce diversos efeitos importantes para a regulação do metabolismo de carboidratos que serão discutidos posteriormente.

Após sua entrada na célula, a glicose é fosforilada pela ação da enzima hexocinase (HK). A glicose-6-fosfato (G6P) formada como produto nessa reação possui destinos muito variados, podendo ser incorporada a outras moléculas, como o glicogênio e outros glicoconjugados, ou seguir por duas vias metabólicas, a via das pentoses-fosfato e a glicólise. A glicólise é uma via central do catabolismo de carboidratos, composta por um conjunto de dez reações catalisadas por enzimas citosólicas, na qual a glicose é oxidada produzindo duas moléculas de piruvato, duas moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e dois equivalentes reduzidos de nicotinamida adenosina dinucleotídeo (NADH). A glicólise é uma das principais vias para geração de ATP celular e ocorre em todos os tipos celulares. Dentre as dez enzimas que participam da glicólise, três catalisam reações essencialmente irreversíveis em condições fisiológicas, a hexocinase (HK), a 6-fosfofruto-1-cinase (PFK) e a piruvato cinase (PK). Essas enzimas são consideradas os principais alvos regulatórios em todo o fluxo glicolítico, apresentando múltiplas formas de regulação (MULUKUTLA et al., 2010; SOLA-PENNA et al., 2010).

O piruvato gerado a partir da glicose pode seguir vias metabólicas distintas: uma parcela do piruvato sintetizado será reduzido pela enzima lactato desidrogenase (LDH) gerando lactato e reoxidando o NADH formado durante a glicólise; outra parcela pode sofrer a ação do complexo piruvato desidrogenase (PDH), no interior da mitocôndria. Esse complexo catalisa uma reação irreversível, possuindo como substratos o piruvato, NAD^+ e coenzima A livre (CoA), liberando como produtos da reação o acetil-CoA, CO_2 e NADH. O acetil-CoA gerado pode condensar-se com uma molécula de oxalacetato formando citrato, que pode entrar no ciclo do ácido cítrico iniciando uma série de reações oxidativas. Em cada ciclo completo de reações do ciclo do ácido cítrico são gerados quatro co-substratos reduzidos: três NADH e uma flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH_2). O NADH e o FADH_2 liberam os seus elétrons na cadeia transportadora de elétrons onde ocorrerá a síntese de ATP e a redução do oxigênio (O_2) em água pela fosforilação oxidativa. O acetil-CoA, que não é utilizado na

produção de energia, é usado como precursor para a síntese de ácidos graxos ou se condensa para a síntese de colesterol no citosol. O acetil-CoA é incapaz de atravessar a membrana mitocondrial, mas pode se combinar com o oxalacetato gerando citrato, este é transportado para o citosol onde é clivado pela ATP:citrato liase (ACL). O acetil-CoA e outros intermediários do ciclo do ácido cítrico podem resultar, além do catabolismo de glicose, do catabolismo de aminoácidos e ácidos graxos (BUCHAKJIAN E KORNBLUTH, 2010). A visão geral do metabolismo de carboidratos está esquematizada na Figura 1.

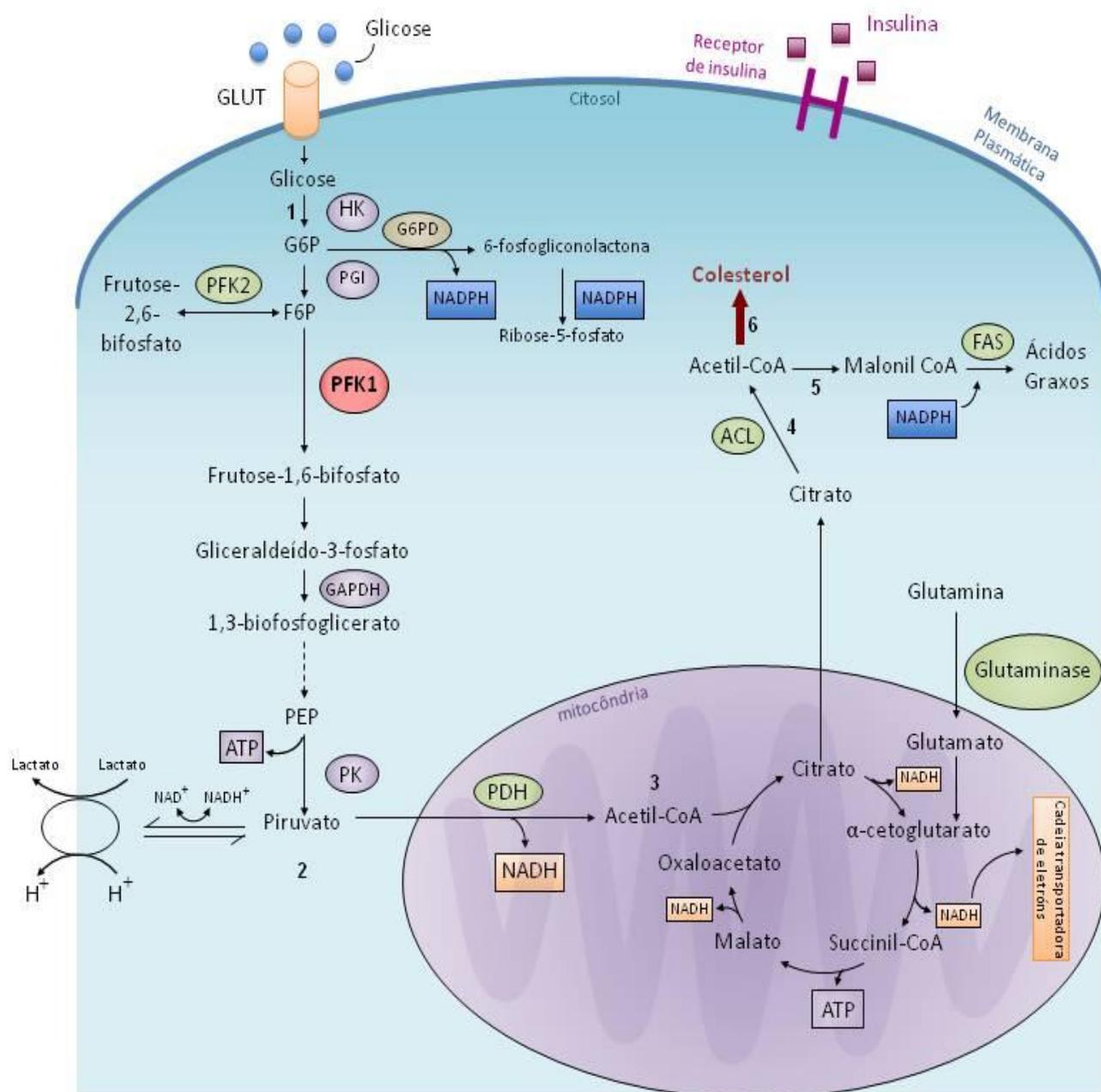


Figura 1: Visão geral do metabolismo de carboidratos. Adaptado de Buchakijan e Kornbluth, Nature Reviews, 2010. (1) A glicose entra na célula através de GLUT e pode ser oxidada na glicólise ou iniciar a Via das pentoses-fosfato; (2) O piruvato, produto final da glicólise, pode ser reduzido a lactato pela LDH ou sofrer ação da PDH na mitocôndria, gerando acetil-CoA; (3) O acetil-CoA formado entra no ciclo do ácido cítrico gerando NADH, que será utilizado para a produção de ATP através da fosforilação oxidativa; (4) O acetil-CoA se combina com o oxaloacetato gerando citrato, que é transportado para o citosol onde sofre ação da ACL gerando novamente acetil-CoA; (5) O acetil-CoA, que não é utilizado na produção de energia, é utilizado como precursor para a síntese de ácidos graxos; (6) ou se condensa para a via de biossíntese de colesterol/ via do mevalonato no citosol. GLUT, transportador de glicose; G6P, glicose-6-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; HK, hexocinase; PGI, fosfoglicoisomerase; PFK1, 6-fosfofruto-1-cinase; PFK2, 6-fosfofruto-2-cinase; GAPDH, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; PK, piruvato cinase; LDH, lactato desidrogenase; PDH, piruvato desidrogenase; ACL, ATP citrato liase; ACC, acetil-CoA carboxilase; FAS, ácido graxo sintase.

Como dito anteriormente, a ativação de AKT exerce diversos efeitos importantes para a regulação do metabolismo de carboidratos, além de estar envolvida na síntese de proteínas, na sobrevivência celular (anti-apoptótica), na regulação de fatores de transcrição e na progressão do ciclo celular. A ativação de AKT regula positivamente diferentes níveis do metabolismo de glicose. Em primeiro lugar induz a expressão e a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática favorecendo a entrada de glicose na célula. A ativação de AKT também é capaz de promover a associação da HK à proteína anti-apoptótica BCL2 presente na mitocôndria, essa associação aumenta a atividade da HK e impede a liberação do citocromo c para o citoplasma, dificultando a ativação da cascata de apoptose. A AKT ativa a glicólise através da fosforilação e consequente ativação da 6-fosfofruto-2-cinase (PFK2). A PFK2 catalisa a formação de frutose-2,6-bifosfato (F2,6BP) através da transferência de um fosfato do ATP para a frutose-6-fosfato (F6P), a F2,6BP é o principal ativador alostérico descrito para a PFK. A ACL, principal enzima responsável pela síntese citosólica de acetil-CoA, também é ativada em resposta a fosforilação de AKT mediada através da sinalização insulinêmica. O produto dessa reação, o acetil-CoA, é precursor para diversas vias biossintéticas importantes, incluindo a biossíntese de ácidos graxos e a biossíntese de colesterol. Além disso, a fosforilação de AKT, permite o aumento da expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol através da ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBP) (MULUKUTLA et al., 2010), que é o fator de transcrição responsável pelo controle da expressão gênica de uma variedade de genes necessários na captação e síntese de colesterol, ácidos graxos, triglicerídios e fosfolipídios (BROWN E GOLDSTEIN, 1997). A via de sinalização de AKT está esquematizada na Figura 2.

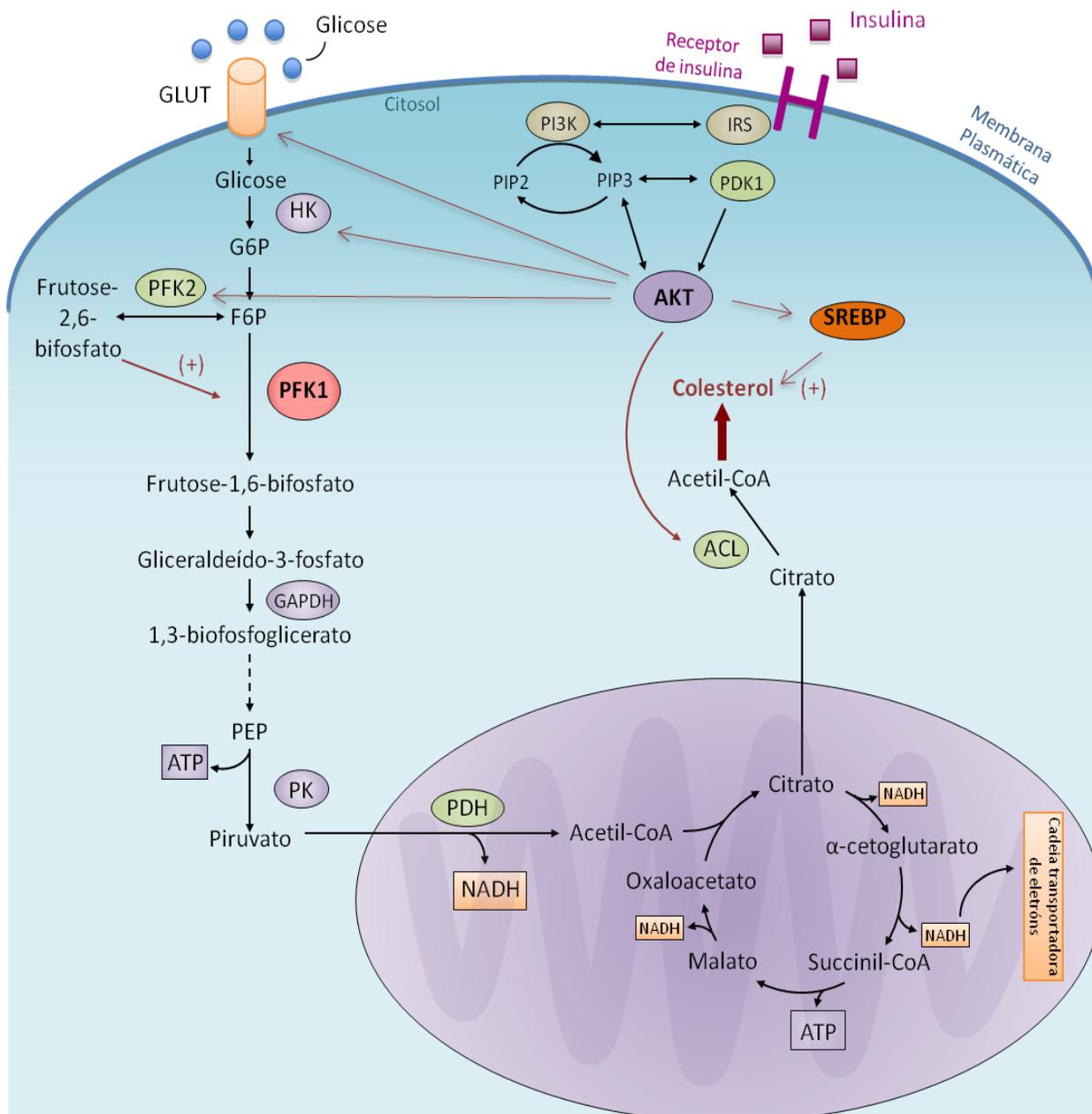


Figura 2: Regulação do metabolismo de carboidratos mediada por AKT. Adaptado de Buchakijan e Kornbluth, Nature Reviews, 2010. A ligação da insulina à subunidade α do domínio extra-celular do RI induz uma mudança conformacional resultando na auto-fosforilação do receptor. O receptor fosforilado ativa fosfatidil inositol 3-cinase (PI3K), que fosforila fosfatidil inositol 4,5-bifosfato em fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato que atua como segundo mensageiro levando a fosforilação de AKT (ou proteína cinase B). AKT estimula a glicólise aumentando a expressão e promovendo a translocação de GLUT; aumentando a atividade da HK, através da sua associação com uma proteína presente na membrana mitocondrial; e aumentando a atividade da PFK2. AKT ativa a ATP citrato liase, enzima que catalisa a formação de acetil-CoA a partir de citrato. AKT promove aumento da expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol através da ativação da SREBP. GLUT, transportador de glicose; G6P, glicose-6-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; HK, hexocinase; PFK1, 6-fosfofruto-1-cinase; PFK2, 6-fosfofruto-2-cinase; GAPDH, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; PK, piruvato cinase; PDH, piruvato desidrogenase; ACL, ATP citrato liase; ACC, acetil-CoA carboxilase; SREBP, proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol.

A PFK catalisa a terceira reação da via glicolítica, a transferência do grupo fosfato gama terminal do MgATP^{2-} para a F6P, formando frutose-1,6-bifosfato (F1,6BP) e adenosina difosfato (ADP). São descritas três isoformas de monômeros da PFK, com diferente distribuição tecidual, capazes de formar homo e heterooligômeros. Em músculo esquelético adulto a única subunidade expressa é a PFK-M (85,2 kDa) e em fígado a isoforma predominante é a PFK-L (85,0 kDa). Cérebro e demais tecidos, incluindo tecido adiposo, apresentam a isoforma PFK-P (85,6 kDa), além das outras duas, PFK-M e PFK-L. A PFK-M é a única isoforma expressa em todos os tipos celulares de mamíferos. A PFK apresenta papel central na regulação de todo o fluxo glicolítico, conseqüentemente sua atividade é controlada por diversos moduladores, sinais e outros ligantes (GETTY-KAUSHIK et al., 2010; SOLA-PENNA et al., 2010; MOR, CHEUNG E VOUSDEN, 2011). Um dos mecanismos de regulação da PFK é a alteração no equilíbrio entre as diferentes conformações oligoméricas da enzima. Os monômeros da PFK se associam rapidamente formando dímeros, a dimerização é essencial para a manutenção da estrutura terciária da enzima, visto que os monômeros são extremamente instáveis e se desdobram com facilidade (SOLA-PENNA et al., 2010). Dímeros de PFK apresentam atividade residual que normalmente é inferior a 5% da atividade enzimática máxima, que é observada na conformação tetramérica da enzima (MARINHO-CARVALHO et al., 2009). O equilíbrio dinâmico entre as conformações oligoméricas da enzima pode ser afetado por diversos fatores como, por exemplo, concentração da enzima, temperatura, pH, ligantes alostéricos fisiológicos e fármacos (SOLA-PENNA et al., 2010). Em meio ácido e temperaturas elevadas as conformações oligoméricas de maior complexidade se dissociam formando dímeros, por outro lado em meio alcalino e temperaturas mais baixas a estabilização das conformações oligoméricas mais complexas, como os tetrâmeros, é favorecida (SOLA-PENNA et al., 2010).

A PFK é capaz de se ligar a um grande número de outras proteínas, incluindo as principais formadoras do citoesqueleto, actina filamentosa (f-actina) e tubulina (SOLA-PENNA et al., 2010). O processo de associação da PFK com proteínas do citoesqueleto é um processo dinâmico e finamente regulado e, também, desempenha

um papel central no controle da atividade da enzima e de todo fluxo glicolítico (LIOU E ANDERSON, 1980; ANDRÉS, CARRERAS E CUSSÓ, 1996; ROBERTS E SOMERO, 1987; CHEN-ZION, BASSUKEVITZ E BEITNER, 1992; SILVA et al., 2003). A interação da PFK com f-actina do citoesqueleto forma uma estrutura macromolecular capaz de estabilizar a conformação tetramérica da enzima e aumentar a sua atividade catalítica (REAL-HOHN et al., 2010). Essa interação é favorecida por diversos sinais, incluindo estímulos hormonais, já que as formas fosforiladas da PFK tem uma maior afinidade pela f-actina que as formas defosforiladas (ALVES E SOLA-PENNA, 2003; COELHO, COSTA E SOLA-PENNA, 2007; SOLA-PENNA et al., 2010). A PFK pode ser fosforilada em resíduos de serina, treonina e tirosina, dependendo da proteína cinase envolvida. Independentemente do resíduo fosforilado, a fosforilação estabiliza a conformação tetramérica da enzima, modificando a ativação da enzima por F6P, pois diminui o índice de cooperatividade da PFK para esse substrato e torna a enzima menos susceptível à inibição pelo ATP, além de aumentar sua afinidade pela f-actina (COELHO, COSTA E SOLA-PENNA, 2007; SOLA-PENNA et al., 2010).

A atividade catalítica da PFK também pode ser alterada em resposta a uma grande variedade de ligantes alostéricos fisiológicos e a mudanças no nível energético da célula. A PFK é inibida por ATP e ativada por ADP e AMP, ou seja, elevados níveis de ATP indicam que a glicólise deve ser reduzida, evitando a síntese de ATP desnecessária, o que é conseguido através da inibição da PFK (MOR, CHEUNG E VOUSDEN, 2011). O ATP pode inibir a PFK em diferentes níveis de acordo com o estado metabólico em que a célula se encontra, já que a concentração intracelular de ATP varia entre 2 e 5 mM e a enzima apresenta dois sítios de ligação distintos para o ATP: o sítio catalítico, de alta afinidade, e o sítio alostérico inibitório, de baixa afinidade (SOLA-PENNA et al., 2010). O lactato, um dos produtos finais da glicólise, inibe reversivelmente a atividade da PFK através da dissociação de tetrâmeros em dímeros, e potencializa os efeitos inibitórios promovidos por concentrações elevadas de ATP (LEITE et al., 2007; 2011). Após uma grande entrada de piruvato na mitocôndria, resultante de uma elevada taxa glicolítica, o citrato, gerado a partir do ciclo do ácido cítrico, deixa a mitocôndria e inibe diretamente a atividade da PFK (SOLA-PENNA et

al., 2010). Os ácidos graxos de cadeia longa também demonstraram uma inibição direta, potente, porém reversível na atividade da PFK. Além disso, na presença de ADP e AMP observou-se uma proteção contra a inibição que não é observada na presença de ATP, indicando que a inibição da PFK promovida pelos grupos acil-CoA presentes nos ácidos graxos de cadeia longa depende do estado energético da célula (JENKINS et al, 2011). A F2,6BP é capaz de regular alostericamente as enzimas PFK e frutose-1,6-bifosfatase (F1,6BPase), regulando simultaneamente a glicólise e a gliconeogênese, através da ativação da PFK e da inibição da F1,6BPase (MOR, CHEUNG E VOUSDEN, 2011). A F2,6BP atua de maneira sinérgica com o ADP e AMP, ambos efetores alostéricos positivos da PFK, sendo capaz de contrabalançar a inibição da PFK causada por altas concentrações de ATP (ZANCAN et al., 2007, 2008; GRECHI et al., 2011). Observa-se que os metabólitos que regulam a atividade da PFK são importantes marcadores de estado energético da célula (SOLA-PENNA et al., 2010), e por sua vez são agentes fundamentais na adaptação celular a alterações nas condições metabólicas sistêmicas, respondendo aos diferentes estímulos hormonais, principalmente ao da insulina, através de mecanismos de *feedback*. Uma visão geral dos ligantes alostéricos fisiológicos envolvidos na regulação da atividade catalítica da PFK está esquematizada na Figura 3.

O colesterol é um esteróide extremamente relevante na integração do metabolismo celular. Além de ser precursor para a síntese de hormônios esteróides, oxisteróis e ácidos biliares, metabólitos que desempenham importantes funções fisiológicas, apresenta papel estrutural importante em membranas plasmáticas, sendo necessário para a diferenciação de todos os tipos celulares (CHANG et al., 2006). A demanda fisiológica de colesterol é suprida através da biossíntese endógena (~ 85%) e da ingestão do esterol (~15%). Quase todas as células estão envolvidas na biossíntese de colesterol, no entanto, o fígado é capaz de sintetizar quantidade superior à todos os demais tecidos em conjunto (GOEDEKE E FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012). A biossíntese de colesterol ocorre no retículo endoplasmático e no citoplasma a partir de acetil-CoA através da via do mevalonato (GOEDEKE E FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012). Citosolicamente, duas moléculas de acetil-CoA são convertidas em acetoacetyl-CoA pela tiolase. Este produto é condensado com uma terceira molécula de acetil-CoA formando β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), numa reação catalisada pela enzima HMG-CoA sintetase. Em seguida, a HMG-CoA redutase, uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso, converte HMG-CoA em mevalonato. Essa etapa é considerada limitante para a via em questão e é o principal alvo dos fármacos utilizados na redução do colesterol, as estatinas (RUDNEY E SEXTON, 1986; GOEDEKE E FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012). Após a formação do mevalonato, uma série de fosforilações e carboxilações formam uma estrutura isoprenóide constituída de cinco átomos de carbono, o isopentenil pirofosfato (IPP). Esse composto se condensa gerando um intermediário de dez carbonos, o geranyl pirofosfato (GPP) e, posteriormente, um intermediário de quinze carbonos, o farnesil pirofosfato (FPP) (RUDNEY E SEXTON, 1986). Duas moléculas de FPP se condensam para a formação do esqualeno. A ciclização do esqualeno forma o lanosterol que contém os quatro anéis do núcleo esteróide presentes na molécula de colesterol. O lanosterol é, então, convertido a colesterol em uma série de aproximadamente 20 reações de oxidação, remoção ou migração de grupos metila. O colesterol recém-sintetizado é direcionado para a membrana plasmática e assim torna-se disponível para aceptores extracelulares. O colesterol livre pode ser rapidamente convertido em éster de colesterol pela acil-coenzima A: colesterol aciltransferase (ACAT). Na presença de excesso de

colesterol a ACAT sofre uma mudança conformacional tornando-se capaz de catalisar a transferência de um ácido graxo da coenzima A para o grupo hidroxila do colesterol, tornando o colesterol ainda mais hidrofóbico (LI et al, 2010). Em mamíferos, a síntese de colesterol é regulada pela concentração de colesterol intracelular, que inibe a HMG-CoA redutase e por diferentes hormônios anabolizantes (e.g. insulina, IGF entre outros) e catabolizantes (e.g. glucagon e adrenalina), que, respectivamente, estimulam e inibem a HMG-CoA redutase.

Tanto o colesterol da dieta como o sintetizado nas células são transportados na circulação sanguínea na forma de lipoproteínas plasmáticas. O mesmo é verdadeiro para os ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolípidios. Existem diferentes lipoproteínas que diferem entre si pelo tipo de proteína que apresentam e pela proporção entre os diferentes componentes lipídicos. Como consequência, essas lipoproteínas apresentam diferentes tamanhos e densidades. Em ordem decrescente de tamanho e crescente de densidade temos os quilomícrons, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL). Além das diferenças supracitadas, essas lipoproteínas apresentam diferentes funções fisiológicas. O colesterol da dieta é absorvido pelos enterócitos no intestino delgado e lançado para circulação sanguínea e linfática na forma de quilomícrons, que são metabolizados nos hepatócitos. No fígado, os lipídeos provenientes dos quilomícrons, junto com os que são sintetizados nesse órgão, são lançados na veia hepática na forma de VLDL. Essa lipoproteína é metabolizada pela lipoproteína lipase (LPL) presente principalmente em adipócitos e músculo esquelético. Nesses tecidos, a LPL metaboliza os triacilgliceróis presentes nas VLDLs, transferindo-os para dentro das células. Como consequência, há uma diminuição na proporção de triacilgliceróis nos VLDL, que perdem em tamanho e ganham em densidade, transformando-se em IDL ou LDL, de acordo com a extensão da metabolização das VLDLs. A IDL apresenta metabolismo muito lento, sendo majoritariamente metabolizadas por macrófagos, que as fagocitam e as destroem após um choque oxidativo. Os macrófagos, após esse metabolismo, podem gerar as conhecidas células esponjosas (*foam cells*), diretamente

envolvidas na formação das placas ateromatosas. A LDL é metabolizada em praticamente todos os outros tecidos, ligando-se aos receptores de LDL e sendo internalizadas pelas células. Este é o principal mecanismo pelo qual a maioria dos tecidos obtêm colesterol e fosfolipídeos, para a formação de membranas. No caso específico das gônadas e das suprarenais, essa também é a principal fonte de colesterol utilizada para a síntese de hormônios esteróides. A HDL é sintetizada no fígado e no intestino delgado como uma partícula pequena, rica em proteínas e contendo pouco colesterol. A HDL contém, na sua superfície, uma enzima capaz de catalisar a formação de ésteres de colesterol a partir de lecitina e colesterol, a lecitina-colesterol acil transferase (LCAT). O excesso de ésteres de colesterol formado é transferido para lipoproteínas ricas em triglicerídios pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). Os remanescentes da CETP são convertidos em LDL e removidos via receptor de LDL ou diretamente removidos no fígado para a excreção na forma de ácidos biliares (LIENSEL-NITSCHKE E TALL, 2005). Além disso, as HDLs ligam-se aos receptores *scavengers* em diferentes tecidos, que realizam o transporte de colesterol de dentro das células para as lipoproteínas. Assim, a HDL participa na redistribuição fisiológica do colesterol captado pelos diferentes tecidos e órgãos, quando há um excesso do metabólito, ocorre uma formação grande de IDL, resultando no aumento da formação de células esponjosas e no risco de incidência de doenças ateromatosas.

Uma vez que o substrato para síntese de colesterol é acetil-CoA citosólico, formado a partir de citrato, que sai da mitocôndria principalmente quando a entrada de piruvato na organela é grande em função de uma elevada taxa glicolítica, é evidente que existe uma estreita correlação entre a via glicolítica e a síntese de colesterol. Visto também que ambas as vias devem ser coordenadamente reguladas a fim de efetuar transições metabólicas de extrema relevância para o metabolismo de carboidratos um possível mecanismo regulatório envolvendo o colesterol e a PFK não poderia ser descartado. Acreditamos que o colesterol seja capaz de atuar como um marcador de estado metabólico da célula, regulando a atividade da PFK e, por sua vez, regulando

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Baseado no papel crítico da PFK na glicólise e tendo em vista a relação evidenciada entre essa via e a via de biossíntese de colesterol, este trabalho tem como objetivo:

Investigar o efeito do colesterol sobre a atividade e a estrutura da PFK, propondo um possível mecanismo regulatório do colesterol sobre o metabolismo glicolítico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

ATP, F6P, estearato de colesteril, acetato de colesteril, colesterol-3-sulfato de sódio, cloreto de colesteril e colesterol foram obtidos da Sigma Chemical Co. MA, EUA. ^{32}Pi foi obtido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (São Paulo, SP). Os demais reagentes utilizados apresentavam grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Purificação da Enzima

A PFK foi purificada a partir de músculo esquelético de coelho segundo o protocolo proposto por Kemp (1975), adaptado do original descrito por Parmeggiani et al. (1966).

Extração: O coelho sofreu eutanásia por deslocamento cervical, seguido de exsanguinação, os músculos da região dorsal e das patas traseiras foram removidos, limpos e mantidos em gelo. O músculo foi pesado cortado em pequenos pedaços e processado em tampão 1 (30 mM NaF, 4 mM EDTA e 15 mM β -mercaptoetanol, pH 7,5), na proporção de 3:1, por 30 segundos no liquidificador. A preparação foi mantida em gelo e sob agitação por 30 minutos. A preparação foi então centrifugada a 14.000xg por 10 minutos a 4°C (Hitachi-Himac). O sobrenadante foi filtrado com gaze para a remoção dos resíduos lipídicos e o pH ajustado para 6,8 com adição de 1,5 M de Tris.

Precipitação com Isopropanol: A preparação foi mantida em constante agitação em gelo com sal grosso. Álcool isopropílico gelado (1/5 do volume total do extrato) foi adicionado gota a gota à preparação, ao final, a temperatura da solução estava a -4°C, e permaneceu sob agitação por mais 20 minutos. O precipitado foi coletado por centrifugação a 14.000xg por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (Hitachi-Himac) e dissolvido em 1/15 da fração inicial em tampão 2 (0,1 M Tris-fosfato, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM frutose 1,6-bifosfato, 1 mM β -mercaptoetanol, 5 mM pirofosfato de

sódio, pH 8,0). Essa suspensão foi dialisada *overnight* a 8°C contra o mesmo tampão para a remoção do isopropanol remanescente.

Tratamento à Quente: A suspensão dialisada foi transferida para um becker e colocada em banho maria a 70°C, sob agitação. A temperatura da suspensão foi mantida entre 57 e 59°C por 3 minutos quando, então, foi retirada e condicionada em banho de gelo até atingir a temperatura de 4°C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 30.700xg por 15 minutos a 4°C.

Fracionamento por Sulfato de Amônio (38 - 55%): Ao sobrenadante, mantido em banho de gelo sob agitação, foi adicionado sulfato de amônio sólido até atingir 38% de saturação (21,3 g/ 100 ml da solução inicial). Após 30 minutos, o precipitado foi removido por centrifugação a 14.000xg por 15 minutos a 4°C (Hitachi-Himac). O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até atingir 55% de saturação (10,1 g/ 100 ml da solução inicial). O precipitado foi coletado por centrifugação a 14.000xg por 30 minutos e dissolvido em tampão 3 (50 mM Tris-fosfato, 0,2 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoetanol, 5 mM pirofosfato de sódio, pH 8,0).

3.2.2 Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry et al. (1951). O padrão utilizado em todas as dosagens foi a albumina de soro bovino (BSA).

3.2.3 Síntese de ATP radioativo

O [γ -³²P] ATP foi preparado de acordo com Maia et al. (1983). A síntese do [γ -³²P] ATP acontece em um meio contendo 0,115 mM Tris-HCl, 0,0276 mM MgCl₂, 0,0138 mM DTT, 0,276 μM L-α-glicerofosfato, 1,15 μM β-NAD, 0,115 μM ADP e 2,3 μM piruvato pela adição de 1 ml ³²P e 40 μl de um coquetel enzimático de marcação, contendo glicerol-3-fosfato desidrogenase, triose-fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato cinase e lactato desidrogenase. Durante 90 minutos esse meio de reação foi incubado em temperatura ambiente, após este período, o ³²P livre foi retirado da mistura através de uma coluna DOWEX 1 x 10 Mesh

ativada em 1 M de HCl. Em seguida o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP formado foi aliqotado e avaliado em um contador de cintilação líquida (Modelo Tri-Carb Perkin Elmer) e posteriormente mantido a -20°C .

3.2.4 Ensaio radiométrico para quantificação da atividade da PFK

A atividade da PFK foi medida através do método direto radiométrico desenvolvido por Sola-Penna e colaboradores 2002, com as modificações introduzidas por Zancan e Sola-Penna (2005a e 2005b). A PFK foi pré-incubada a 37°C na presença de colesterol, controles na ausência de colesterol foram realizados com o veículo de diluição do colesterol dimetil sulfóxido (DMSO). Após pré-incubação, $1\ \mu\text{g/ml}$ da PFK purificada foi avaliada em um meio contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 , 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM F6P and 0,1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP ($4\ \mu\text{ci}/\mu\text{mol}$), a menos quando indicado. A reação foi interrompida, após 10 minutos, pela adição de 1 mL de suspensão de carvão ativo (250 g/L) contendo 0,1 N HCl e 0,5 M manitol. Após centrifugação do material, 0,4 ml do sobrenadante foram retirados e a radioatividade presente foi avaliada pela quantidade de $[1\text{-}^{32}\text{P}]$ frutose-1,6-bifosfato formada. A atividade da PFK foi calculada por regressão linear da quantidade de $[1\text{-}^{32}\text{P}]$ frutose-1,6-bifosfato formada durante a fase linear da reação em função do tempo de reação. Duplicatas foram feitas para todas as amostras e os brancos obtidos na ausência de F6P foram subtraídos de todos os resultados.

3.2.5 Espectro de fluorescência intrínseca

Os espectros de fluorescência intrínseca da PFK purificada foram analisados em um espectro fluorímetro JASCO 6300 (INC. MD. EUA). A PFK purificada ($5\ \mu\text{g/ml}$) foi diluída em meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 e concentrações variadas de colesterol (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mM). As amostras foram colocadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de $1,0 \times 1,0\ \text{cm}$ e excitadas em 280 nm. A fluorescência emitida foi medida num espectro de 300 nm a 400 nm. A partir desse espectro foi calculado o centro de massa espectral que reflete o grau de exposição do triptofano ao solvente. O centro de massa espectral foi calculado pela equação I:

$$c.m. = \frac{\sum \lambda \cdot I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}}$$

Onde :

Σ = somatório

I_{λ} = intensidade de fluorescência em um dado comprimento de onda (λ)

λ = comprimento de onda

3.3 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão dos experimentos. A análise estatística e as regressões lineares e não-lineares dos dados foram realizadas através do programa Sigma Plot (v. 10,0, Systat Inc., CA, USA) integrado ao software SigmaStat (v. 3.2, Systat Inc. CA, USA). Os valores para cada grupo foram comparados através dos testes Student's Newman Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$. Os parâmetros cinéticos da PFK para o ATP foram calculados considerando os dois componentes da modulação da PFK por este metabólito. O primeiro componente é o componente estimulatório para a curva de saturação do substrato, para o qual a PFK exibe um padrão alostérico descrito pela equação II:

$$V = \frac{V_{\max_{app}} \times [ATP]^{n_s}}{K_{0,5}^{n_s} + [ATP]^{n_s}}$$

Onde:

V = atividade da PFK em uma dada concentração de ATP

$V_{\max_{app}}$ = velocidade máxima aparente

$K_{0,5}$ = constante de afinidade para o componente estimulatório

n_s = índice de cooperatividade do componente estimulatório

O segundo componente é o componente inibitório que pode ser ajustado pela equação III:

$$V = \frac{V_{\text{sat}} \times I_{0,5}^{n_i}}{I_{0,5}^{n_i} + [\text{ATP}]^{n_i}}$$

Onde:

V = atividade da PFK em uma dada concentração de ATP

$I_{0,5}$ = constante de afinidade para o componente inibitório

n_i = índice de cooperatividade para o componente inibitório

V_{sat} = atividade da PFK quando o primeiro componente está saturado

Os parâmetros cinéticos da PFK para a F6P foram calculados através de regressão não-linear utilizando os dados experimentais para ajustar os parâmetros da equação IV:

$$V = \frac{V_{\text{max}} \times [\text{F6P}]^n}{K_{0,5} + [\text{F6P}]^n}$$

Onde:

V = atividade da PFK em uma dada concentração de F6P

V_{max} = velocidade máxima para saturar as concentrações de F6P

$K_{0,5}$ = constante de afinidade para F6P

n = índice de cooperatividade

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da pré-incubação com colesterol sobre a atividade da PFK

Com o objetivo de caracterizar o comportamento catalítico da PFK purificada a partir de músculo esquelético de coelho na presença de colesterol, avaliamos a atividade da enzima após 30 minutos de pré-incubação com colesterol 0,1 mM. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, o DMSO. Esse tratamento promoveu uma inibição de aproximadamente 20% na atividade da enzima (Figura 5A). Embora seja um efeito singelo, há uma forte dependência no tempo de pré-incubação. Ao avaliarmos os efeitos do colesterol sobre a atividade da PFK em função do tempo de pré-incubação, observamos claramente que a inibição aumenta em função do tempo (Figura 5B). Deve ser notado que o controle realizado na presença de DMSO também perde sua atividade em função do tempo de pré-incubação. Isso se deve, provavelmente, a desnaturação da enzima na presença do solvente. Entretanto, fica nítido que na presença de colesterol, a perda de atividade é maior, quando comparada ao controle, fortalecendo a conclusão de que o colesterol é capaz de inibir a atividade da enzima.

Com o intuito de melhor caracterizar a inibição da PFK promovida por colesterol, avaliamos os efeitos de diferentes concentrações do esterol sobre a atividade da enzima após 60 minutos de pré-incubação. Observa-se um efeito dependente da concentração de colesterol, mostrando uma inibição máxima calculada de aproximadamente 80% e um $I_{0.5}$ de aproximadamente 0,05 mM (Figura 6). A partir desses dados, inferimos que o colesterol é capaz de promover a inibição da atividade catalítica da PFK de maneira dependente da concentração do metabólito e do tempo de exposição da enzima ao colesterol.

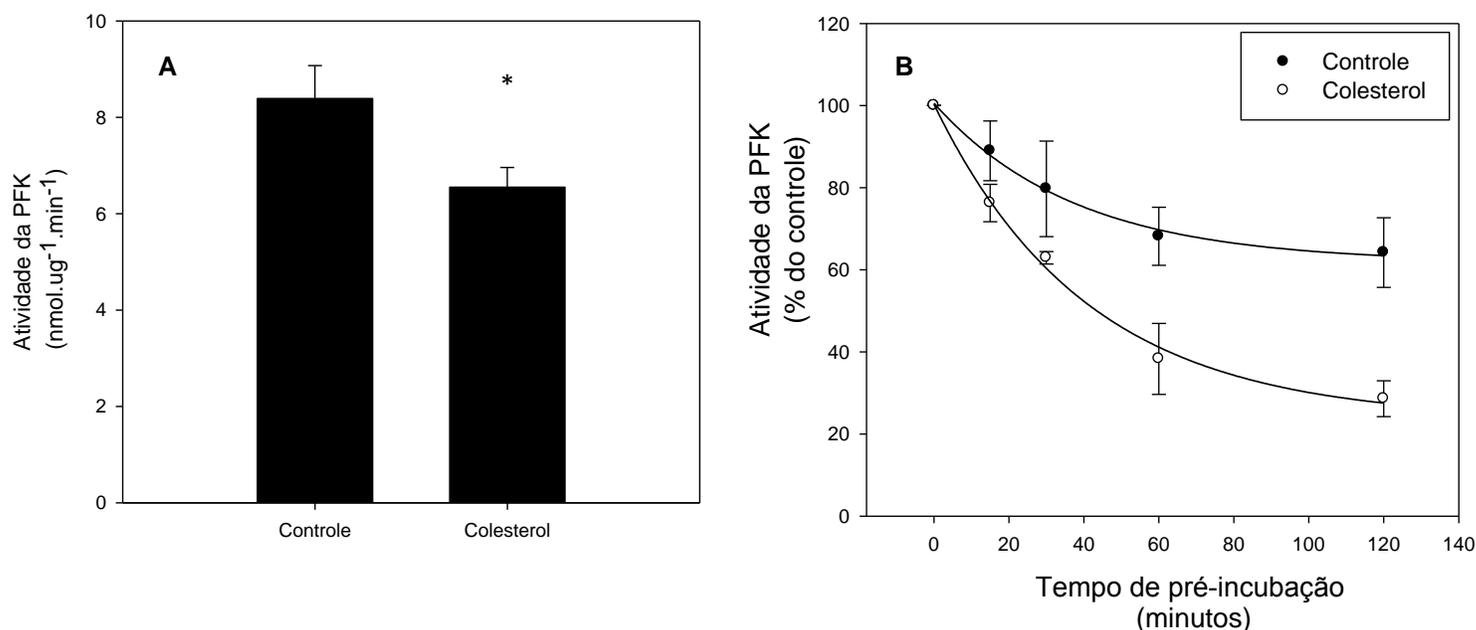


Figura 5: Atividade da PFK após pré-incubação na presença de colesterol. (A) Pré-incubação por 30 minutos. A enzima (1 μ g/mL) foi pré-incubada na presença de 0,1 mM de colesterol durante 30 minutos a 37°C. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Atividade da PFK está expressa em nmol. μ g⁻¹.min⁻¹ de F1,6BP. Valores plotados correspondem a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes (n=3). *P < 0,05 quando comparado ao controle (Student's Newman Keuls). (B) Pré-incubação em diferentes tempos. A enzima foi pré-incubada na presença de 0,1 mM de colesterol em diferentes tempos (0, 15, 30, 60, 120 minutos) a 37°C. Aliquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi mensurada pelo método radiométrico. Atividade da PFK está expressa como percentual dos respectivos controles (tempo zero). Valores plotados correspondem a média \pm erro padrão de cinco experimentos independentes (n=5).

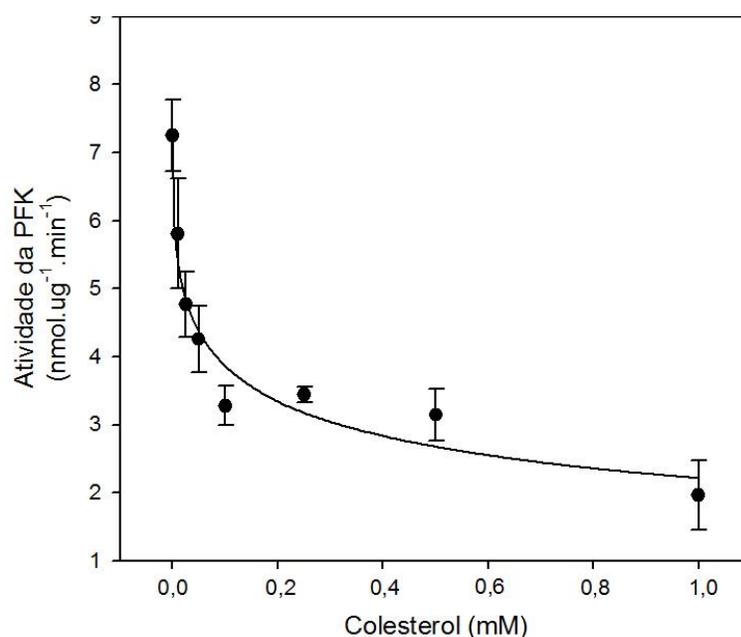


Figura 6: Atividade da PFK após pré-incubação por 60 minutos na presença de concentrações variadas de colesterol. A enzima (1 μ g/mL) foi pré-incubada na presença de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1mM de colesterol por 60 minutos a 37°C. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Aliquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi mensurada através do método radiométrico, descrito em Material e Métodos. Valores plotados correspondem a média \pm erro padrão de dez experimentos independentes (n=10).

4.2 Avaliação da afinidade da PFK pelos seus substratos na presença de colesterol

Para investigar o mecanismo pelo qual o colesterol inibe a atividade da PFK, é importante avaliar o efeito desse esterol sobre a afinidade da enzima por seus substratos, F6P e ATP. Esses ensaios fornecem parâmetros cinéticos importantes como a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), $K_{0,5}$ (constante de afinidade - concentração de F6P/ATP capaz de promover 50% da velocidade máxima), $I_{0,5}$ para ATP (concentração na qual é atingida a metade da inibição máxima da reação enzimática promovida por ATP) e o índice de cooperatividade (n). A PFK apresenta dois sítios de ligação distintos para ATP, sendo um dos sítios de alta afinidade, o sítio catalítico, com constante de afinidade de aproximadamente 0,15 mM e o outro sítio de baixa afinidade, o sítio inibitório, com constante de afinidade de aproximadamente 2,5 mM. Em condições fisiológicas, a concentração intracelular de ATP varia entre 2 e 5 mM e, conseqüentemente, o ATP pode inibir a PFK em diferentes níveis dependendo do estado metabólico em que a célula se encontra (SOLA-PENNA et al., 2010). Dessa forma, a avaliação dos efeitos de concentrações crescente de ATP sobre a atividade da PFK gera uma curva bifásica, sendo a enzima ativada até ATP 1 mM, quando a enzima passa a ser inibida por este metabólito. Esse perfil inibitório do ATP pode ser evidenciado na Figura 7, na qual também observamos que a presença de colesterol foi capaz de inibir a atividade da enzima em todas as concentrações de ATP. Essa inibição é, aparentemente, proporcional para todas as concentrações de ATP. Isso torna-se evidenciado pelo fato de não haver modificação das afinidades de ambos os sítios para ATP e tampouco do índice de cooperatividade destes sítios. Por outro lado, há uma diminuição de, aproximadamente 35 % na V_{max} da enzima avaliada por estes experimentos (Tabela I).

Os efeitos do colesterol sobre a modulação da enzima pelo substrato F6P também foram testados. De forma similar ao descrito acima, os efeitos inibitórios promovidos pelo colesterol também são observados em todas as concentrações de F6P testadas (Figura 8), com conseqüente redução da V_{max} da enzima sem afetar significativamente a afinidade por este substrato ou o índice de cooperatividade (Tabela I).

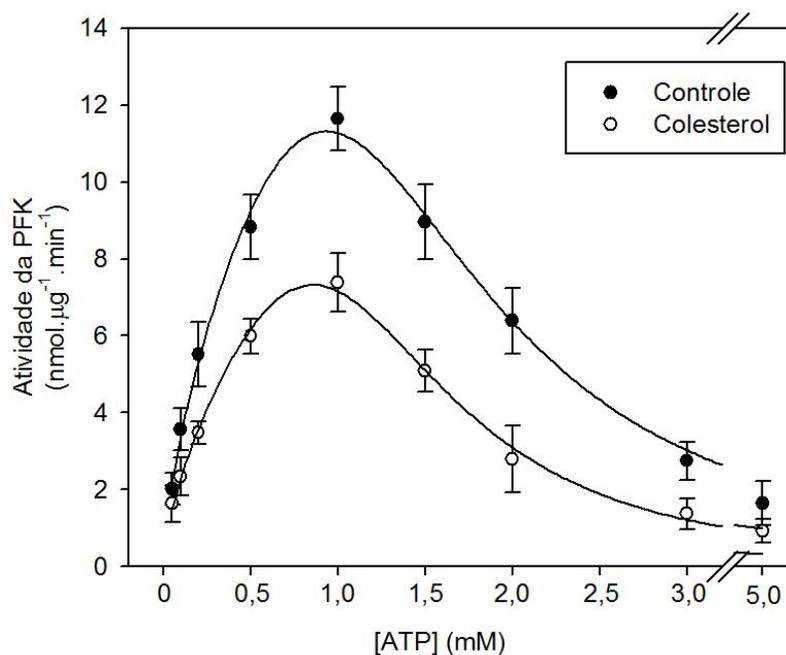


Figura 7: Efeito do colesterol sobre a atividade da PFK em diferentes concentrações de ATP. A enzima foi pré-incubada na presença de 0,1 mM de colesterol por 1h a 37°C. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Aliquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi mensurada através do método radiométrico, na presença de concentrações variadas (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 e 5 mM) de um dos substratos da enzima, o ATP. Valores plotados correspondem a média \pm erro padrão de dez experimentos independentes (n=10).

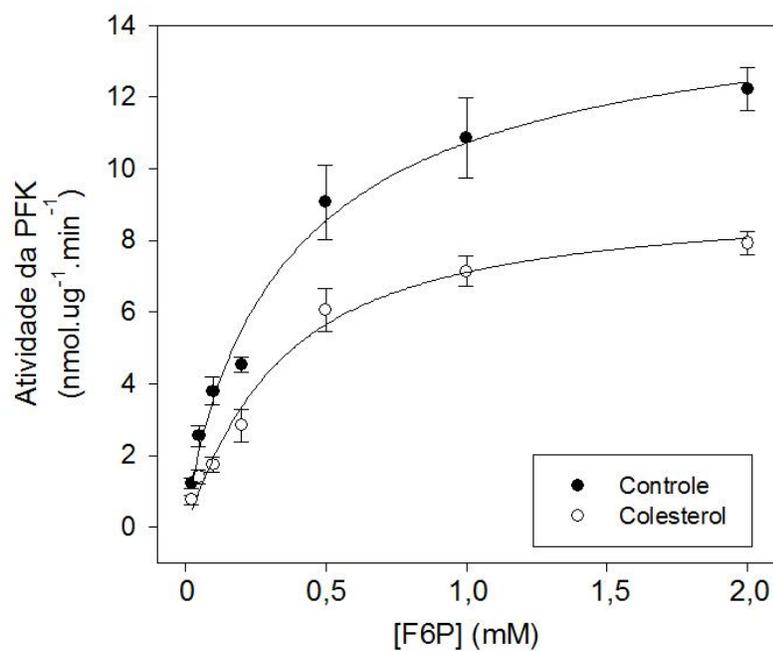


Figura 8: Efeito do colesterol sobre a atividade da PFK em diferentes concentrações de F6P. A enzima foi pré-incubada na presença de 0,1 mM de colesterol a 37°. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Aliquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi mensurada através do método radiométrico, na presença de concentrações variadas (0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2mM) de um dos substratos da enzima, a F6P. Valores plotados correspondem a média \pm erro padrão de sete experimentos independentes (n=7).

		CONTROLE	COLESTEROL
ATP	$K_{0.5}$ (mM)	$0,25 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$
	n_s	$1,129 \pm 0,05$	$0,9732 \pm 0,06$
	$V_{max_{app}}$ (nmol. μg^{-1} .min $^{-1}$)	$12,1 \pm 1,2$	$7,8 \pm 1,1^*$
	$I_{0.5}$ (mM)	$2,0 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$
	n_i	$1,8 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$
F6P	V_{max} (nmol. μg^{-1} .min $^{-1}$)	$13,5 \pm 1,1$	$8,9 \pm 0,6^*$
	$K_{0.5}$ (mM)	$0,38 \pm 0,09$	$0,61 \pm 0,22$
	n	$0,8 \pm 0,0^\#$	$1,5 \pm 0,2$

Tabela I: Efeitos do colesterol sobre os parâmetros cinéticos da PFK purificada de músculo esquelético de coelho na presença de 0,1 mM de colesterol. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Os parâmetros foram calculados baseados nas figuras 7 e 8. * $P < 0,05$ comparado ao controle. $^\#$ A dispersão excessiva dos valores não permite calcular o erro padrão para esse parâmetro.

4.3 Avaliação da atividade da PFK na presença de colesterol em condições físicas variadas

Como citado anteriormente, a PFK responde às variações de pH do meio alterando seu equilíbrio oligomérico em um processo dinâmico. A inativação é acompanhada pela variação na concentração de íons H^+ do meio. Em meio ácido, a inativação da enzima pode ser correlacionada com a mudança da forma tetramérica ativa para a forma dimérica fracamente ativa. Por outro lado, em meio básico a forma tetramérica da enzima, que apresenta atividade máxima, é estabilizada e torna-se menos susceptível à alterações no meio reacional (MARINHO-CARVALHO et al., 2006, 2009; LEITE et al., 2007). Em vista disso, investigamos o padrão inibitório promovido pelo colesterol frente à mudanças no pH do meio de reação. Observamos que o colesterol é capaz de inibir a PFK mesmo em pH acima de 8,0 (Figura 9), faixa de pH em que a enzima encontra-se na sua forma tetramérica e apresenta atividade máxima.

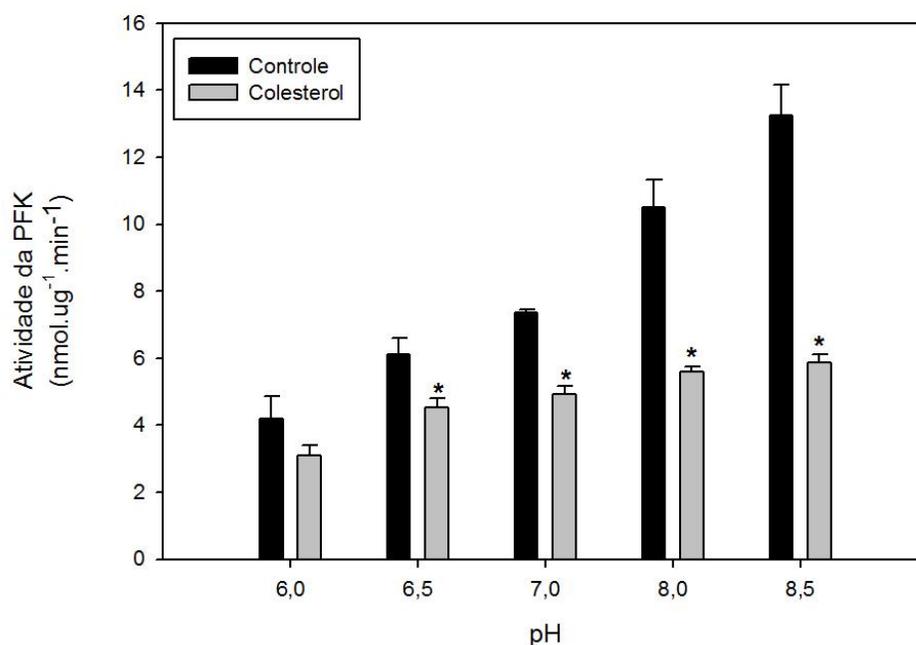


Figura 9: Efeito do colesterol na atividade da PFK em condições variadas de pH. A enzima foi pré-incubada na presença de 0,1 mM de colesterol por 1h a 37°C, em diferentes condições de pH no meio de reação. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Aliquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi mensurada, através do método radiométrico. *P < 0,05 quando comparado ao controle (Student's Newman Keuls). Valores plotados correspondem a média ± erro padrão de dez experimentos independentes (n=10).

A temperatura de pré-incubação também é um fator limitante na regulação do equilíbrio oligomérico da PFK, por esse motivo esse parâmetro também foi investigado na presença de colesterol. A inativação térmica da PFK em temperaturas acima de 50°C não segue um padrão hiperbólico devido a complexa estrutura oligomérica da enzima, ou seja, durante os primeiros minutos de incubação a enzima está muito estável e sua atividade não é alterada (FABER-BARATA E SOLA-PENNA, 2005). Esse perfil pode ser observado na Figura 10, na qual após 10 minutos de pré-incubação a PFK não responde à presença de colesterol em nenhuma das temperaturas testadas. Por outro lado, com o passar do tempo de pré-incubação o colesterol potencializa a inativação da PFK promovida pela pré-incubação em temperatura elevada (55°C).

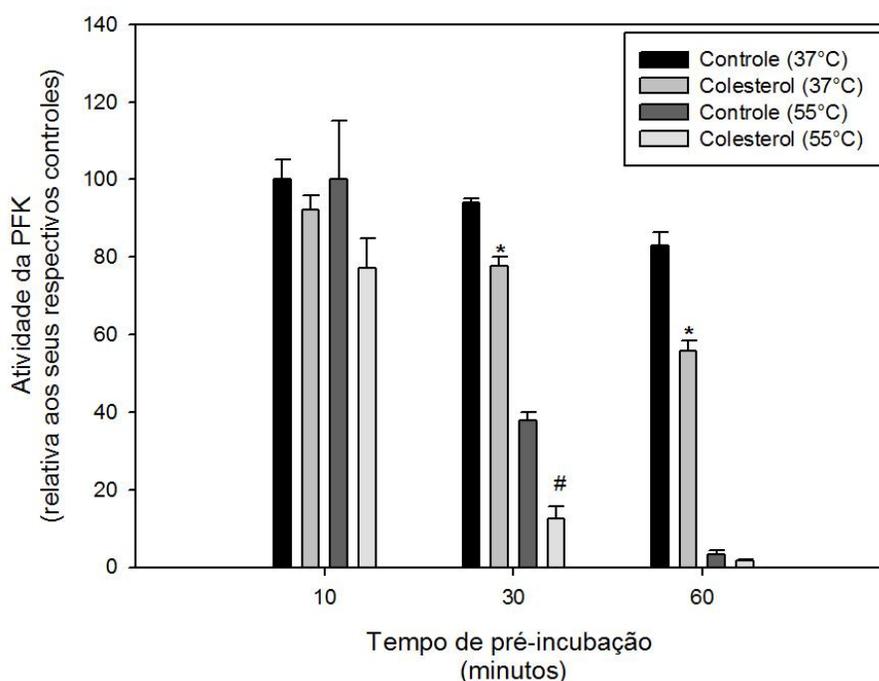


Figura 10: Termoinativação da PFK na presença de colesterol em função do tempo de pré-incubação. A enzima foi pré-incubada na presença de 0,1 mM de colesterol por 1h a 37°C e 55°C. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Alíquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi mensurada, através do método radiométrico. *P < 0,05 quando comparado ao controle 37°C (Student's Newman Keuls). #P < 0,05 quando comparado ao controle 55°C (Student's Newman Keuls). Valores plotados correspondem a média ± erro padrão de seis experimentos independentes (n=6).

4.4 Avaliação do efeito do colesterol na atividade da PFK na presença de diferentes moduladores alostéricos da enzima

A avaliação do efeito do colesterol na atividade da PFK na presença de diferentes moduladores alostéricos da enzima, que são caracterizados por alterar seu equilíbrio oligomérico, auxilia na investigação dos mecanismos pelos quais o colesterol promove sua inibição. Uma ampla variedade de ligantes alostéricos fisiológicos são capazes de regular a atividade da PFK. São considerados potentes ativadores da atividade da enzima AMP, ADP, ATP (< 1 mM) e F2,6BP, esses metabólitos podem contrabalançar os efeitos inibitórios promovidos pelo ATP. E como inibidores, além do ATP (> 1 mM), citrato, lactato e fosfoenolpiruvato podem atuar potencializando os efeitos inibitórios promovidos pelo ATP (MARINHO-CARVALHO et al., 2006, 2009; LEITE et al., 2007, SOLA-PENNA et al., 2010). A concentração intracelular de todos esses metabólitos, que atuam interferindo no equilíbrio entre as formas oligoméricas da PFK, é crítica para a regulação da atividade da enzima (MARINHO-CARVALHO et al., 2006, 2009; LEITE et al., 2007, SOLA-PENNA et al., 2010). Observamos na Figura 11, que a inibição promovida pelo colesterol é parcialmente revertida na presença de F2,6BP, o principal ativador alostérico da PFK descrito. Por outro lado, na presença de citrato essa inibição é potencializada. Somados, esses resultados mostrados até aqui são fortes indicativos de que o colesterol não é capaz de afetar a conformação oligomérica da enzima (SOLA-PENNA et al., 2010). Podemos sugerir que assim como outros metabólitos que regulam a atividade da PFK, como ATP e citrato, o colesterol pode atuar como um marcador de estado metabólico da célula, sinalizando para uma inibição da enzima quando se faz necessário.

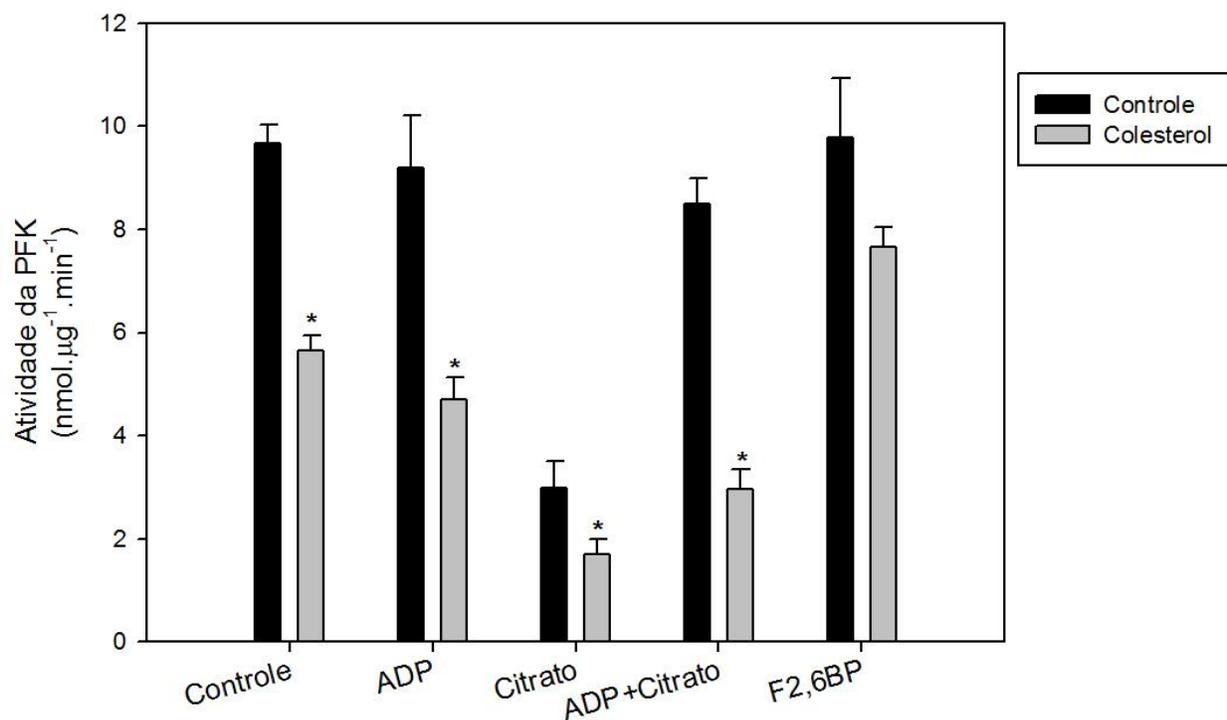


Figura 11: Efeito do colesterol sobre a atividade da PFK na presença de diferentes moduladores alostéricos da enzima. A enzima foi pré-incubada na presença de 0,1 mM de colesterol por 1h a 37°C, controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Aliquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi mensurada, através do método radiométrico. Foram utilizados os moduladores alostéricos positivos ADP (5 mM) e F2,6BP (100 µM); e o modulador alostérico negativo, citrato (10 mM). *P < 0,05 quando comparado ao controle 37°C (Student's Newman Keuls). Valores plotados correspondem a média ± erro padrão de dez experimentos independentes (n=10).

4.5 Efeito do colesterol sobre a estrutura quaternária da PFK

A fim de avaliar os efeitos do colesterol sobre a estrutura quaternária da PFK, analisamos o centro de massa no espectro de fluorescência intrínseca da enzima na presença de colesterol. Foi demonstrado por nosso laboratório que esse parâmetro pode ser utilizado para avaliar a transição, entre dímeros e tetrâmeros da PFK, induzida por diferentes tipos de ligantes. Uma vez que os dímeros apresentam seus triptofanos mais expostos ao meio polar, o centro de massa de seu espectro de fluorescência intrínseca apresenta-se deslocado para regiões de menor energia e maior comprimento de onda do espectro quando submetidos à excitação de 280 nm (MARINHO-CARVALHO et al., 2006; LEITE et al., 2007; ZANCAN et al., 2007). Calculando o centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da enzima, observamos que as concentrações de colesterol promovem uma diminuição no centro de massa de forma concentração-dependente (Figura 12). Este comportamento não é compatível com o comportamento observado quando há deslocamento da enzima da sua forma tetramérica para a sua forma dimérica, corroborando a hipótese de que o mecanismo inibitório promovido pelo colesterol é independente da alteração no equilíbrio oligomérico da enzima.

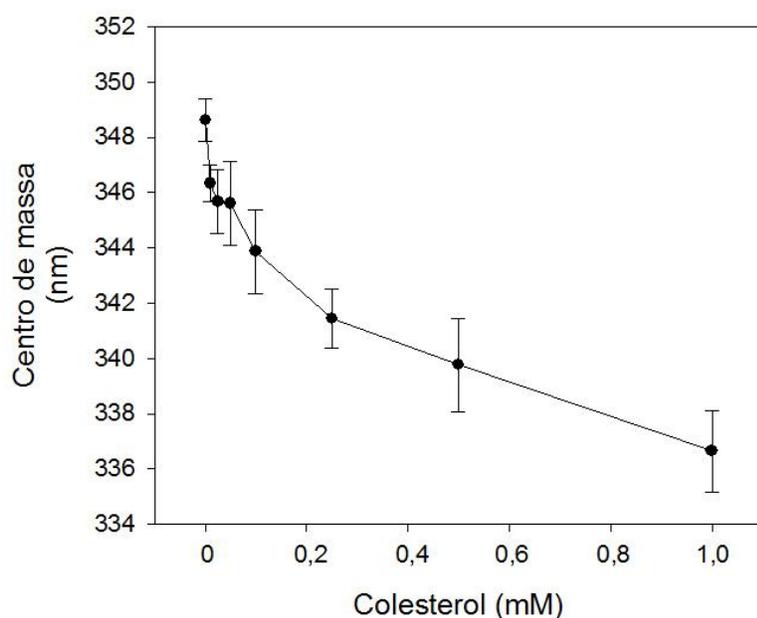


Figura 12: Efeito do colesterol sobre o centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da PFK. A enzima foi pré-incubada na presença de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mM de colesterol por 1h a 37°C. Controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. O centro de massa foi calculado a partir do espectro de fluorescência intrínseca analisado em um espectrofluorímetro utilizando a equação I. Valores plotados correspondem a média \pm erro padrão de cinco experimentos independentes (n=5).

4.6 Efeitos da pré-incubação com esteróis derivados do colesterol sobre a atividade da PFK

Uma parte significativa do colesterol intracelular é metabolizado através de sua esterificação com ácidos graxos. Assim, decidimos testar os efeitos de ésteres de colesterol (estearato de colesteril e acetato de colesteril) e do colesterol com substituições hidrofílicas na posição 3 do núcleo esteroide (cloreto de colesteril e colesterol-3-sulfato de sódio). As estruturas dos compostos utilizados estão representadas na Figura 13.

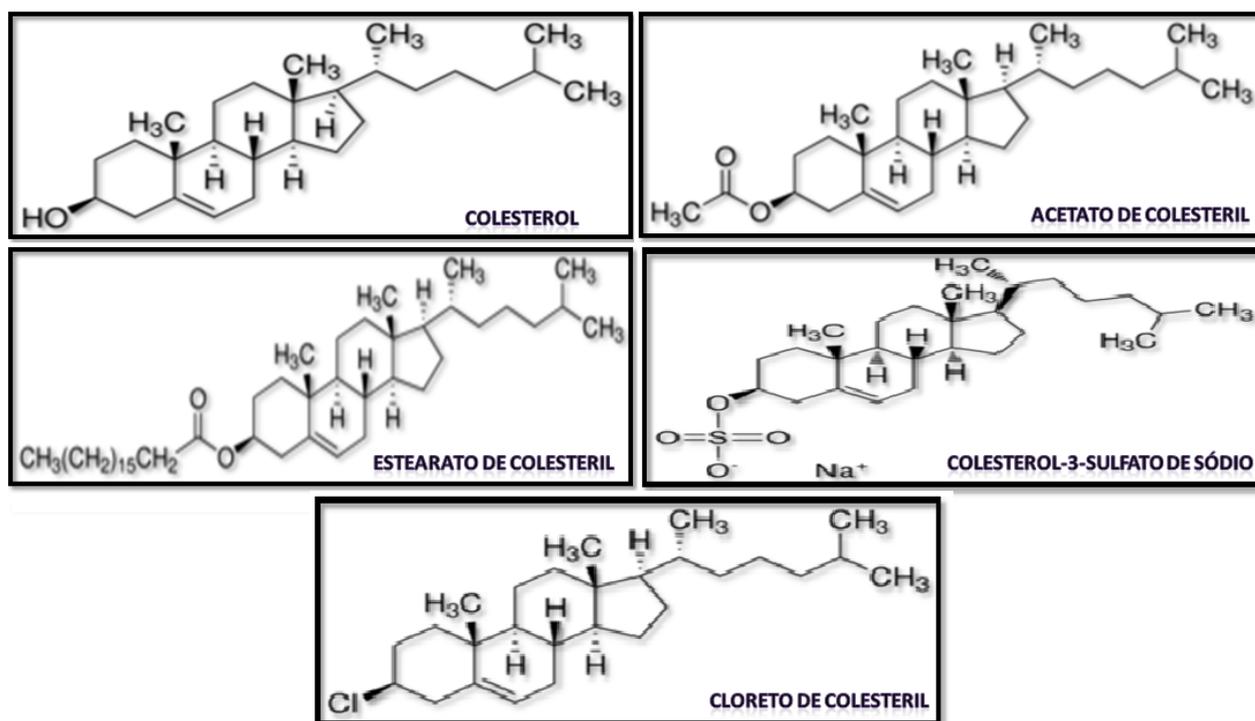


Figura 13: Estrutura molecular dos derivados de colesterol. Fonte: Sigma-Aldrich.

A enzima foi pré-incubada durante 30 e 60 minutos na presença de 0,1 mM de cada um desses compostos e a sua atividade avaliada em sequência (Figura 14). Pode-se observar que todas as moléculas foram capazes de inibir a enzima (Figura 14). O cloreto de colesteril apresentou perfil de inibição bastante similar ao do colesterol. Por outro lado, o estearato de colesteril e o acetato de colesteril apresentaram maior eficiência inibitória, evidenciada após 30 minutos de pré-incubação. Essa mesma eficiência foi observada com o colesterol-3-sulfato de sódio.

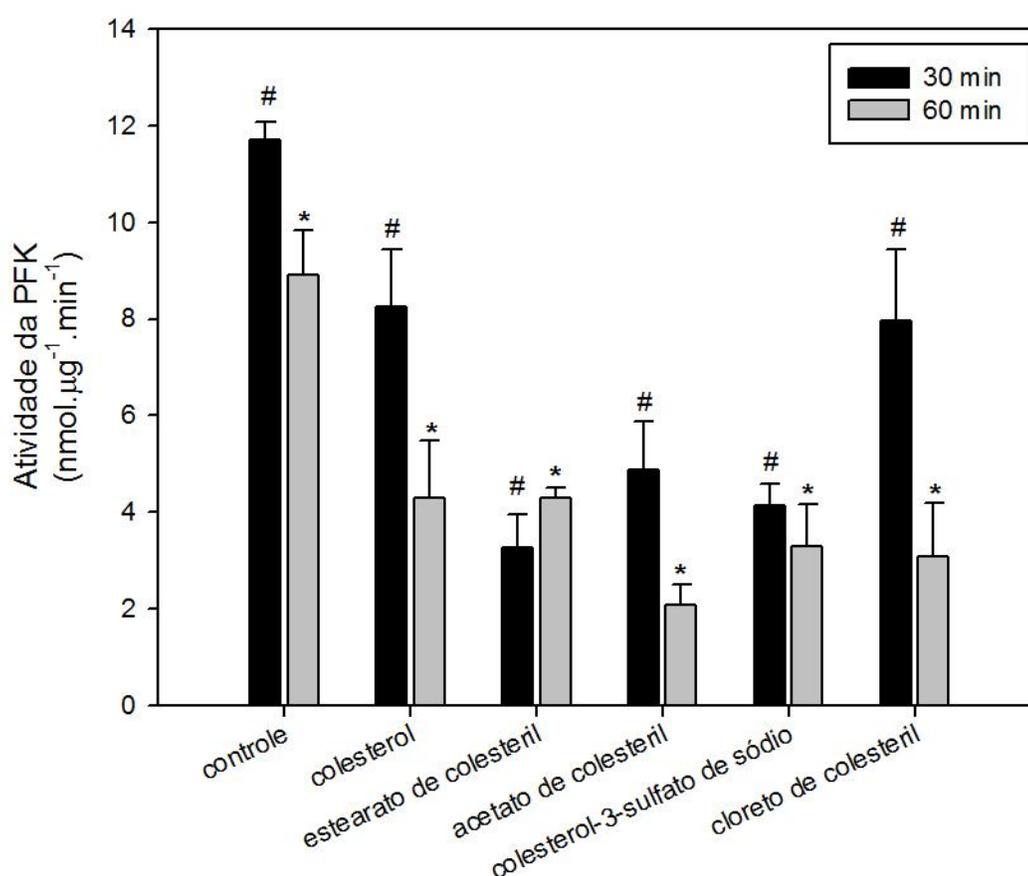


Figura 14: Efeitos da pré-incubação com esteróis derivados do colesterol sobre a atividade da PFK purificada. A enzima foi pré-incubada na presença de 0,1 mM de colesterol, estearato de colesteril, acetato de colesteril, colesterol-3-sulfato de sódio e cloreto de colesteril por 30 e 60 minutos a 37°C, controles na ausência de colesterol foram realizados utilizando o veículo de diluição do colesterol, DMSO. Alíquotas foram retiradas e a atividade enzimática foi mensurada, através do método radiométrico. #P < 0,05 quando comparado ao controle após 30 minutos de pré-incubação (Student's Newman Keuls). *P < 0,05 quando comparado ao controle após 60 minutos de pré-incubação (Student's Newman Keuls). Valores plotados correspondem a média ± erro padrão de seis experimentos independentes (n=6).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O pâncreas endócrino secreta insulina ou glucagon em resposta às variações na concentração da glicose plasmática, promovendo a regulação de inúmeros processos metabólicos, entre eles o metabolismo glicolítico e a síntese de colesterol. Flutuações da glicemia promovem flutuações em iguais proporções no transporte de glicose para as células β das ilhotas pancreáticas e na sua fosforilação no citosol dessas células. Essa correlação entre as flutuações da glicemia e o transporte e fosforilação da glicose se dá em função da presença do GLUT 2 e da hexocinase 4 nessas células, que apresentam a afinidade por glicose compatível com as flutuações fisiológicas do açúcar (LEE, MAGKOS et al., 2011; ASHCROFT E RORSMAN, 2012). A secreção de insulina por essas células responde a flutuações intracelulares da concentração de ATP, que por sua vez varia em função da atividade glicolítica. Como consequência, há uma correlação direta entre a entrada e fosforilação de glicose nas células β pancreáticas e a secreção de insulina por essas células. A insulina regula negativamente a secreção de glucagon pelas células α das ilhotas pancreáticas. Dessa forma, a glicemia regula diretamente a insulinemia e indiretamente a glucagonemia. Esta contraregulação da secreção desses dois hormônios tem um papel fisiológico importante pois eles têm efeitos antagônicos sobre várias vias metabólicas. Insulina e glucagon, respectivamente, estimulam e inibem a glicólise, a síntese de ácidos graxos e a biossíntese de colesterol, por exemplo, por seus efeitos em enzimas-chave dessas vias, como a PFK, a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a HMG-CoA redutase (LEE, MAGKOS et al., 2011; ASHCROFT E RORSMAN, 2012).

Pelo exposto acima, pode-se traçar uma estreita correlação entre os metabolismos glicolítico e lipídico em diferentes tecidos. Com aumentos da glicemia e sua consequente ação sobre a secreção de insulina, ocorre um aumento da glicólise, produzindo mais piruvato que, entre outros destinos metabólicos, é convertido em acetil-CoA dentro das mitocôndrias através da piruvato desidrogenase (PDH). Esse acetil-CoA reage com oxaloaceto, numa reação catalisada pela citrato sintase, gerando citrato e CoA livre. O citrato, por sua vez, pode ser isomerizado em isocitrato pela aconitase mitocondrial ou sair da mitocôndria, através dos transportadores de

tricarboxilatos, e ser metabolizado citosolicamente pela ATP:citrato liase (ACL), que utiliza também CoA gerando oxaloacetato e acetil-CoA citosólicos. A ativação da ACC e da HMG-CoA redutase pela insulina, aumenta a metabolização citosólica de acetil-CoA no citosol, favorecendo a saída de citrato da mitocôndria (ROTTIERS E NAAR, 2012). Dessa forma, delinea-se a integração entre a glicólise a síntese de lipídeos (ácidos graxos e colesterol), tendo como reguladores comuns a insulina e o glucagon.

Os dados mostrados nesta dissertação demonstram que o colesterol é capaz de inibir a PFK, um dos principais pontos de regulação da via glicolítica. Além de ser uma modulação inédita sobre a PFK, a ação do colesterol sobre a enzima evidencia um mecanismo de regulação da própria síntese do colesterol. Essa afirmação é baseada no exposto acima onde evidencia-se que a síntese de colesterol é dependente da ativação glicolítica. Assim, uma consequência esperada da inibição da PFK e da consequente diminuição da taxa glicolítica é a diminuição também da formação citosólica de acetil-CoA e, por conseguinte, da síntese de lipídeos. Um mecanismo similar foi recentemente demonstrado, onde acil-CoAs de cadeia longa se mostram como potentes inibidores da PFK (JENKINS et al., 2011). Neste trabalho os autores também correlacionaram essa inibição com a integração regulatória entre a glicólise e a síntese de ácidos graxos (JENKINS et al., 2011). Os dados aqui apresentados contribuem para o entendimento dessa regulação mostrando que além do produto final da síntese de ácidos graxos, o colesterol, produto final da síntese de colesterol, também inibe a PFK e, conseqüentemente, a glicólise.

Vários moduladores da atividade da PFK atuam afetando o equilíbrio entre dímeros e tetrâmeros da enzima (SOLA-PENNA et al., 2010). Os ativadores da enzima, ADP, AMP, AMP cíclico e F2,6BP, favorecem a associação de dímeros formando tetrâmeros, que é o oligômero da enzima com maior atividade. Dessa forma, estes metabólitos promovem a ativação da PFK e da glicólise (SOLA-PENNA et al., 2010). De forma recíproca, vários metabólitos que levam a inibição da PFK e da glicólise promovem a dissociação dos tetrâmeros da enzima favorecendo a formação de dímeros, que apresentam atividade residual (SOLA-PENNA et al., 2010). Esse é o caso da clássica inibição da enzima por ATP (acima de 1 mM) e por lactato, produto da

glicólise fermentativa. Esses são outros exemplos de contraregulação onde produtos de uma via metabólica são capazes de inibir a via em si. No caso do colesterol, não há alteração da conformação quaternária da enzima nem da afinidade da PFK por seus substratos. Reconhecidamente, dímeros da enzima possuem menor afinidade tanto por ATP quanto por F6P (SOLA-PENNA et al., 2010). O colesterol não promoveu alteração da afinidade da enzima por seus substratos, diminuindo apenas a sua velocidade máxima. Tampouco os efetores alostéricos capazes de alterar a estrutura quaternária da PFK foram capazes de afetar significativamente a inibição da enzima pelo colesterol.

A inibição da PFK promovida por acil-CoA também parece não afetar nem a afinidade da enzima por seus substratos, nem o grau de oligomerização da enzima. Pelo contrário, foi demonstrado que ocorre a acilação da PFK em quatro diferentes sítios, resultando na inibição da enzima. No presente trabalho não foi avaliado se o colesterol seria capaz de promover a modificação covalente da PFK, mas essa possibilidade não pode ser descartada e deve ser avaliada num futuro breve. Em consonância com essa possibilidade está a necessidade de um tempo considerável de incubação da enzima com o colesterol para que a inibição seja observada. Entretanto, os resultados obtidos com diferentes apresentações do colesterol não suporta a possibilidade de modificação covalente. O fato de a forma mais provável de ligação do colesterol a PFK ser através da hidroxila na posição 3 e de que diferentes substituições nesta hidroxila não terem impedido os efeitos inibitórios do colesterol enfraquecem a possibilidade de participação desta hidroxila nos efeitos do colesterol sobre a PFK. De qualquer forma, seria interessante a avaliação da PFK incubada com colesterol em um espectrometro de massas pela técnica do MALDI TOF/TOF para averiguar a possibilidade de modificação covalente da enzima pelo colesterol.

Muito embora não tenhamos uma evidência do mecanismo pela qual o colesterol inibe a PFK, nos parece claro que essa inibição tem uma grande relevância metabólica, podendo apresentar importantes correlações com patologias. Por exemplo, é conhecido que a hipercolesterolemia cursa com a tolerância a glicose prejudicada (GADDAM, VENTURA et al., 2011). Embora seja certo que muitos são os fatores

contribuindo para essa correlação, não nos parece despropositado que a inibição da glicólise (em função de uma inibição da PFK) seja proposta como um desses fatores. Na verdade, buscando mais aprofundadamente, há um sem-número de correlações entre patologias envolvendo alterações no metabolismo lipídico e glicídico, todas culminando com a síndrome metabólica (GRUNDY, 2012). Dessa forma, acreditamos que os resultados aqui apresentados sejam apenas uma pequena parte de uma complexa rede regulatória unindo o metabolismo lipídico e a glicólise.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O colesterol promove uma inibição na atividade da PFK de forma dependente do tempo e da concentração, sem alterar a afinidade da enzima por seus substratos F6P e ATP;
- A PFK é inibida pelo colesterol mesmo em condições ótimas, como pH básico, no qual a enzima está na sua forma tetramérica e apresenta atividade máxima;
- O colesterol é capaz de potencializar a inativação da PFK promovida pela pré-incubação em temperatura elevada;
- Os resultados sugerem uma modulação negativa do colesterol sobre a atividade da PFK, apresentando-se como um modulador da enzima e possivelmente do metabolismo glicolítico, atuando como um importante marcador de estado metabólico da célula;
- No entanto, os mecanismos envolvidos a cerca dessa inibição ainda precisam ser elucidados.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- ALVES, G. G.; SOLA-PENNA, M. (2003). **Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase.** Mol. Genet. Metab. 78: 302-306.
- ANDRÉS, V.; CARRERAS, J.; CUSSÓ, R. (1996). **Myofibril-bound muscle phosphofructokinase is less sensitive to inhibition by ATP than the free enzyme, but retains its sensitivity to stimulation by bisphosphorylated hexoses.** Int. J. Biochem. Cell. Biol. 28: 1179-1184.
- ASHCROFT, F. M. AND P. RORSMAN (2012). **Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years.** Cell 148(6): 1160-1171.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. (1997). **The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor.** Cell 89(3): 331-40.
- BUCHAKJIAN M. R.; KORNBLUTH S. (2010). **The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11(10):715-27.
- CHANG, T.; CHANG, C. C. Y.; OHGAMI, N.; YAMAUCHI, Y. (2006). **Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22: 129-157.
- CHEN-ZION, M.; BASSUKEVITZ, Y.; BEITNER, R. (1992). **Insulin rapidly stimulates binding of phosphofructokinase and aldolase to muscle cytoskeleton.** Int. J. Biochem. 24: 1661-1667.
- COELHO, W. S.; COSTA, K. C.; SOLA-PENNA, M. (2007). **Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization.** Mol. Genet. Metab. 92: 364–370.

FABER-BARATA, J.; SOLA-PENNA, M. (2005). **Opposing effects of two osmolytes-trehalose and glycerol - on thermal inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase.** Mol. Cell Biochem. 269: 203-207.

GADDAM, K. K., H. O. VENTURA, ET AL. (2011). **Metabolic syndrome and heart failure--the risk, paradox, and treatment.** Curr Hypertens Rep 13(2): 142-148.

GETTY-KAUSHIK, L.; VIERECK, J. C.; GOODMAN, J. M.; GUO, Z.; LEBRASSEUR, N. K.; RICHARD, A. M.; FLANAGAN, J. N.; YANEY, G. C.; HAMILTON, J. A.; TORNHEIM, K. (2010). **Mice deficient in phosphofructokinase-M have greatly decreased fat stores.** Obesity (Silver Spring) 18(3):434-40.

GOEDEKE, L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. (2012). **Regulation of cholesterol homeostasis.** Cell Mol. Life Sci. 69(6):915-30.

GRECHI, J.; MARINHO-CARVALHO, M.; ZANCAN, P.; CINELLI, L. P.; GOMES, A. M.; RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; SOLA-PENNA, M. (2011).

Glucuronoxylomannan from Cryptococcus neoformans down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. J. Biol. Chem. 286(17):14820-9.

GRUNDY, S. M. (2012). **Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk.** J Am Coll Cardiol 59(7): 635-643.

JENKINS, C. M.; YANG, J.; SIMS, H. F.; GROSS, R. W. (2011). **Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by acyl-CoA: a mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism.** J. Biol. Chem. 286: 11937-11950.

JORNAYVAZ F. R.; SAMUEL V. T.; SHULMAN G. I. (2010). **The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome.** Annu. Rev. Nutr. 21;30:273-90.

KEMP, R. G. (1975). **Phosphofructokinase.** Methods Enzymol., 42: 72-77.

- LEE, Y. H., F. MAGKOS, ET AL. (2011). **Effects of leptin and adiponectin on pancreatic beta-cell function.** *Metabolism* 60(12): 1664-1672.
- LEITE T. C.; COELHO R. G.; DA SILVA D.; COELHO W. S.; MARINHO-CARVALHO M. M.; SOLA-PENNA M. (2011). **Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice.** *FEBS Lett.* 3;585(1):92-8.
- LEITE, T. C.; DA SILVA, D.; COELHO, R. G.; ZANCAN, P; SOLA-PENNA, M. (2007). **Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis.** *Biochem. J.* 408: 123–130.
- LI, J. Z.; LEI, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; YE, J.; XIA, X; PAN, X.; LI, P. (2010). **Control of cholesterol biosynthesis, uptake and storage in hepatocytes by Cideb.** *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 577–586.
- LINSEL-NITSCHKE, P.; TALL, A. R. (2005). **HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease.** *Nat. Rev. Drug Discov.* 4(3):193-205.
- LIU, R. S.; ANDERSON, S. (1980). **Activation of rabbit muscle phosphofructokinase by F-actin and reconstituted thin filaments.** *Biochem.* 19: 2684-2688.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193(1):265-75.
- MAIA, J. C. C.; GOMES, S. L.; JULIANI, M. H. (1983). **Preparation of [α - 32 P] and [γ - 32 P]-nucleoside triphosphate, with high specific activity.** In: C.M. Morel (Ed.) *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual.* Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, Brazil, p. 146-157.
- MARINHO-CARVALHO, M. M.; COSTA-MATTOS, P. V.; SPITZ, G. A.; ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. (2009). **Calmodulin upregulates skeletal muscle 6-**

phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of allosteric modulators.

Biochim. Biophys. Acta 1794: 1175–1180.

MARINHO-CARVALHO, M. M.; ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. (2006). **Modulation of 6-phosphofructo-1-kinase oligomeric equilibrium by calmodulin: Formation of active dimmers.** Mol. Genet. Metab. 87: 253–261.

MOR I.; CHEUNG E. C.; VOUSDEN K. H. (2011). **Control of Glycolysis through Regulation of PFK1: Old Friends and Recent Additions.** Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol. 76:211-6.

MULUKUTLA B.C.; KHAN S.; LANGE A.; HU W.S. (2010). **Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways.** Trends Biotechnol. 28(9):476-84.

PARMEGGIANI, A.; LUFT, J. H.; LOVE, D. S.; KREBS, E. G. (1966). **Crystallization and properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase.** J. Biol. Chem. 241: 4625-4637.

REAL-HOHN A.; ZANCAN P.; DA SILVA D.; MARTINS E. R.; SALGADO L. T.; MERMELSTEIN C. S.; GOMES A. M.; SOLA-PENNA M.(2010). **Filamentous actin and its associated binding proteins are the stimulatory site for 6-phosphofructo-1-kinase association within the membrane of human erythrocytes.** Biochimie 92(5):538-44.

ROBERTS, S. N.; SOMERO, G. N. (1987). **Binding of phosphofructokinase to filamentous actin.** Biochem. 26: 3437-3442.

ROTTIERS, V. AND A. M. NAAR (2012). **MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders.** Nat Rev Mol Cell Biol 13(4): 239-250.

RUDNEY, H.; SEXTON, R. C. (1986). **Regulation of cholesterol biosynthesis.** Annu. Rev. Nutr. 6: 245-272.

SILVA, A. P. P.; ALVES, G. G.; ARAUJO, A. H. B.; SOLA-PENNA, M. (2003). **Effects of insulin and actin on phosphofructokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle.** An. Acad. Bras. Ciênc. 76(3): 541-548.

SOLA-PENNA, M.; DA SILVA, D.; COELHO, W. S.; MARINHO-CARVALHO, M. M.; ZANCAN, P. (2010). **Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism.** IUBMB Life 62: 791-796.

SOLA-PENNA, M.; SANTOS, A. C.; SEREJO, F.; ALVES, G. G.; EL-BACHA, T.; FABER-BARATA, J.; PEREIRA, M. F.; DA POIAN, A. T.; SORENSON, M. (2002). **A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme.** J. Biochem. Biophys. Meth. 50: 129-140.

TATOŃ J.; CZECH A.; PIATKIEWICZ P. (2010) **Insulin as the main regulator of cellular glucose utilization--aetiological aspects of insulin resistance.** Endokrynol. Pol. 61(4):388-94.

ZANCAN P.; MARINHO-CARVALHO M. M.; FABER-BARATA J.; DELLIAS J. M.; 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(8):526-33.

ZANCAN, P.; ROSAS, A. O.; MARCONDES, M. C.; MARINHO-CARVALHO, M. M.; SOLA-PENNA, M. (2007). **Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolitic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase.** Biochem. Pharmacol. 73: 520 – 1527.

ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. (2005a). **Calcium influx: A possible role for insulin modulation of intracellular distribution and activity of 6-phosphofructo-1-kinase in human erythrocytes.** Mol. Genet. Metab., 86: 392-400.

ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. (2005b). **Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: Cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function.** Mol. Genet. Metab., 86: 401-411.