



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA



**O COLESTEROL DE MEMBRANA TEM INFLUÊNCIA
NA SINALIZAÇÃO DE INSULINA E NA REGENERAÇÃO
HEPÁTICA**

Matheus de Castro Fonseca, M.Sc.

Orientadora: Maria de Fátima Leite, Ph.D.

Belo Horizonte, MG

2017

MATHEUS DE CASTRO FONSECA

**O COLESTEROL DE MEMBRANA TEM INFLUÊNCIA
NA SINALIZAÇÃO DE INSULINA E NA REGENERAÇÃO
HEPÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito obrigatório para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Belo Horizonte, MG

2017

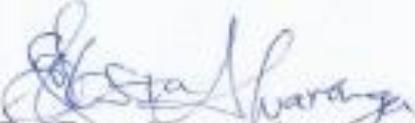
"O COLESTEROL DE MEMBRANA É ESSENCIAL PARA A SINALIZAÇÃO DE INSULINA E PARA A REGENERAÇÃO HEPÁTICA"

MATHEUS DE CASTRO FONSECA

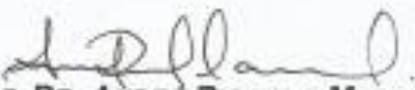
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 15 de fevereiro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

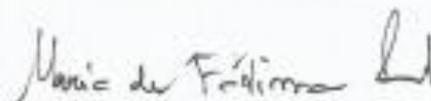

PROFA. DR^a. MARIA DE FÁTIMA LEITE
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DR^a. CARLA JEANE AGUIAR
UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ/BH-MG


PROF. DR. ERIKA LORENA ALVARENGA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REY


PROFA. DR^a. LUCIANA DE OLIVEIRA ANDRADE
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DR^a. MARIA DE FÁTIMA LEITE
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Belo Horizonte, 15 de fevereiro de 2017.

APOIO INSTITUCIONAL E FINANCIAMENTO

Este trabalho foi realizado no laboratório de Sinalização Intracelular de Ca^{+2} (Calcium Lab) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), com o auxílio das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanomateriais de Carbono (INCT-Nano);
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC);

Dedico esta tese a meus pais,

Jaqueline e Sérgio

“Algum dia em qualquer parte, em qualquer lugar,
indefectivamente, encontrarás a ti mesmo, e essa, só essa,
pode ser a mais feliz ou a mais amarga de tuas horas”

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

- A Deus por todo o auxílio e o refúgio concedido nas horas boas e ruins;
- A minha mãe, Jaqueline (*in memoriam*), por toda a força que sempre me deu, por ter motivado meus estudos e por ter sido o motivo pelo qual sempre quis ser um cientista;
- A meu maravilhoso pai, que sempre foi mais do que um pai; foi também uma mãe e um amigo. Obrigado por tudo o que fez e ainda faz por mim, papai!;
- Aos meus queridos avós Fonseca e Zizinha, pela presença constante de grande amor e carinho;
- Às minhas queridas “Tias” pelo carinho, orações, prosas de domingo, viagens pelo mundo e constante presença, sempre empolgadas em me ajudar para o alcance de novas conquistas;
- À melhor orientadora que eu poderia ter tido, Maria de Fátima Leite, que foi quase uma mãe, sempre me ajudando, puxando minha orelha, aconselhando pessoal e profissionalmente e abrindo meus caminhos. Obrigado por ter acreditado nas minhas ideias e por ter feito de mim o profissional que sou hoje. Agradeço por tudo e para sempre! Obrigado pelos cafés da tarde e almoços de domingo com você e com o Vic! Obrigado por tudo, Vic! Amo vocês!
- À minha maravilhosa amiga e aluna de IC, Andressa França, por ter sido uma parceira desde meu início no Calcium Lab e por ter sido meu braço direito neste trabalho, não mostrando limites em me ajudar. Obrigado por me ter ensinado tudo o que aprendi no laboratório. Este trabalho é tanto meu quanto seu;
- Ao meu grande amigo, Rodrigo Machado Carequinha, por ter-me ajudado sempre que precisei, pelas gargalhadas que demos juntos, pelas baladas em que perdemos o rumo de casa e pelo convívio lindo que tivemos estes anos. Você será um amigo que carregarei para a vida, querendo ou não!
- Às minhas pós-docs velhinhas mais maravilhosas Ana Celeste e Sandhroca. Meninas, vocês não imaginam como estar com vocês é importante para mim. Muito obrigado por tudo!
- A todos os meus amigos do Calcium Lab, Débora, Dabny, Plínio, pelo convívio maravilhoso ao longo desses anos. Obrigado por terem feito os dias difíceis serem mais fáceis. Débora, você foi minha primeira aluna “oficial” de IC. Obrigado pela oportunidade e espero ter cumprido bem o meu papel com você;
- A meu amigo José Fonseca, por todo o carinho, pelos conselhos e pela amizade eterna;

- A Naira Lacerda e a todos os amigos do CCAA por toda a amizade, a ajuda e o carinho todos estes anos em que estive com vocês;
- Ao técnico Taquinho pela amizade e ajuda com as atividades no laboratório;
- Ao Gilson, por toda a ajuda no laboratório com os serviços administrativos;
- Às professoras Cristina Guatimosim e Luciana Andrade, que desde meu primeiro ano de graduação sempre me impulsionaram para a vida científica, mesmo quando eu pensei VÁRIAS vezes em desistir;
- Aos meus eternos amigos do LabNeuro, Prica, Hermann e Matheus, que me acompanharam desde a iniciação científica;
- Ao prof. André Gustavo de Oliveira pela valiosa colaboração com os experimentos de sinalização de cálcio *in vivo* e com a escrita do *paper*;
- Ao Pe. Lauro Palú, do Santuário do Caraça, pela criteriosa correção da gramática;
- A todos os amigos e funcionários da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, em especial a Cintya da Secretaria que sempre fez o possível e impossível para me ajudar, além de me dar paçoquinhas para alegrar meu dia;
- Aos colaboradores da Universidade de Yale, Mateus Guerra e Michael Nathanson, por todo o auxílio para a construção e execução deste trabalho;
- A todos os membros da banca de defesa, por colaborarem com a correção e apreciação do meu trabalho;
- Às agências de fomento Capes, CNPq e FAPEMIG, que financiaram este trabalho;
- A Universidade Federal de Minas Gerais por toda a acolhida ao longo destes 8 anos;
- A todos os que, de alguma forma, colaboraram neste trabalho, muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 A membrana celular e os <i>lipid-rafts</i>	18
1.2 A sinalização celular mediada por insulina.....	23
1.3 A regeneração hepática.....	28
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Aspectos éticos.....	34
3.2 Cultura celular	34
3.3 Remoção do colesterol de membrana com M β CD	34
3.4 Imunofluorescência.....	34
3.5 Detecção dos sinais de Ca ⁺² <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	35
3.6 Ensaio de incorporação de BrdU.....	36
3.7 Dosagem de glicose.....	36
3.8 Imunohistoquímica para PCNA.....	37
3.9 <i>Western blot</i>	38
3.10 Hepatectomia parcial e tratamento com lovastatina.....	38
3.11 Dosagem de colesterol.....	38
3.12 Ensaio de MTT.....	39
4 RESULTADOS	40
4.1 O receptor para insulina está localizado nos <i>lipid-rafts</i>	41
4.2 A remoção do colesterol de membrana redistribui o receptor para insulina nas células.....	43
4.3 A sinalização de Ca ⁺² induzida por insulina é dependente da integridade dos <i>lipid-rafts</i>	48

4.4	O metabolismo e a proliferação celular induzidos por insulina <i>in vitro</i> são debilitados devido à desorganização dos <i>rafts</i> de membrana.....	54
4.5	A sinalização de Ca ⁺² induzida por insulina é reduzida em animais tratados com lovastatina.....	58
4.6	A regeneração hepática sofre atraso em animais tratados com lovastatina.....	64
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERÊNCIAS	77
8	ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MODELO DO MOSAICO FLUIDO DE SINGER E NICHOLSON.....	20
FIGURA 2: PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E DINÂMICAS DA MEMBRANA CELULAR EM UM MODELO COMPUTACIONAL E ORGANIZAÇÃO DOS <i>LIPID-RAFTS</i>	21
FIGURA 3: SINALIZAÇÃO ATRAVÉS DO RECEPTOR PARA IMUNOGLOBULINA (Fc) EM <i>LIPID-RAFTS</i>	22
FIGURA 4: MODELO ESQUEMÁTICO DO RECEPTOR PARA INSULINA.....	25
FIGURA 5: MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO DE Ca^{+2} ATIVADA POR RECEPTORES TIROSINA CINASE OU ACOPLADOS À PROTEÍNA G.....	26
FIGURA 6: VIAS DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR PARA INSULINA.....	27
FIGURA 7: REGENERAÇÃO HEPÁTICA APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL.....	30
FIGURA 8: EVENTOS PRINCIPAIS DURANTE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL.....	30
FIGURA 9: O RECEPTOR PARA INSULINA ESTÁ LOCALIZADO EM MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA RICOS EM COLESTEROL.....	42
FIGURA 10: O TRATAMENTO COM M β CD DESORGANIZA OS <i>LIPID-RAFTS</i> E A DISTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR PARA INSULINA NA CÉLULA.....	45 e 46
FIGURA 11: O TRATAMENTO COM M β CD LEVA À INTERNALIZAÇÃO DO RECEPTOR PARA INSULINA.....	47
FIGURA 12: A DESORGANIZAÇÃO DOS <i>LIPID-RAFTS</i> ABOLE A SINALIZAÇÃO DE Ca^{+2} INTRACELULAR INDUZIDA POR INSULINA EM CÉLULAS HepG2	50
FIGURA 13: A DESORGANIZAÇÃO DOS <i>LIPID-RAFTS</i> ABOLE A SINALIZAÇÃO DE Ca^{+2} INTRACELULAR INDUZIDA POR INSULINA EM HEPATÓCITOS.....	51
FIGURA 14: A SINALIZAÇÃO DE Ca^{+2} INDUZIDA POR EGF OU HGF NÃO É ALTERADA EM CONSEQUÊNCIA DA DESORGANIZAÇÃO DOS <i>LIPID-RAFTS</i>	52 e 53
FIGURA 15: O METABOLISMO HEPATOCELULAR DE CARBOIDRATO É ALTERADO DEVIDO À REMOÇÃO DO COLESTEROL MEMBRANAR E CONSEQUENTE DESORGANIZAÇÃO DOS <i>RAFTS</i> DE MEMBRANA.....	56

FIGURA 16: O EFEITO MITOGÊNICO DA INSULINA É REDUZIDO DEVIDO À REMOÇÃO DO COLESTEROL DE MEMBRANA.....	57
FIGURA 17: O TRATAMENTO COM LOVASTATINA ALTERA A ORGANIZAÇÃO CELULAR DE CAVEOLINA-1 E REDUZ O COLESTEROL TOTAL DO FÍGADO DE RATOS.....	60 e 61
FIGURA 18: A SINALIZAÇÃO DE Ca ⁺² INDUZIDA POR INSULINA EM HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS E NO FÍGADO <i>IN VIVO</i> É DEBILITADA EM ANIMAIS TRATADOS COM LOVASTATINA.....	62 e 63
FIGURA 19: A REGENERAÇÃO HEPÁTICA SOFRE ATRASO EM ANIMAIS TRATADOS COM LOVASTATINA.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

%	porcentagem
°C	graus Celsius
μM	micromolar
μL	microlitro
Akt	<i>alpha serine/threonine kinase</i>
AVP	vasopressina
BrdU	bromodeoxiuridina
Cav	caveolina
Cm	centímetros
c-met	proteína tirosina cinase Met
CO₂	dióxido de carbono
Ca⁺²	íon cálcio
CTxB	cólera-toxina subunidade B
DAB	3, 3 -diaminobenzidina
DAG	diacilglicerol
DEN	dietilnitrosamina
dL	decilitro
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK 1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
Fluo-4 / AM	<i>4-(6-Acetoxymethoxy-2,7-difluoro-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2' (ethylenedioxy) dianiline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl) ester</i>
g	grama
GM1	monosialotetrahexosilgangliosídeo
GPI	glicofosfatidilinositol
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>

HGFR	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HMG-CoA reductase	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase
HYCD	2-hidroxiopropil-γ-ciclodextrina
InsP₃	inositol trifostato
InsP₃R	receptor para inositol trifostato
IR	receptor para insulina
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
mL	militro
mM	milimolar
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidefor
MβCD	metil-beta-ciclodextrina
NA	abertura numérica
nM	nanomolar
O₂	oxigênio
p-Akt	<i>phospho- alpha serine/treonine kinase</i>
PBS	salina-fostato tamponada
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
p-ERK 1/2	<i>phospho- extracellular signal–regulated kinases 1/2</i>
PH	hepatectomia parcial
pH	potencial hidrogeniônico
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinase
PIP₂	fosfatidilinositol 2-fostato
PKB	proteína cinase B
PKC	proteína cinase C
PLC	fosfolipase C
Pps	pulsos por segundo
RTK	receptor tirosina cinase
Src	<i>steroid receptor coactivator</i>
TBST	<i>tris-buffered saline</i>
TGFβ	<i>tumor growth factor beta</i>
V	volts
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

RESUMO

Introdução e objetivos: O fígado está constantemente sujeito a lesões por enterotoxinas e/ou outras substâncias que entram no organismo. Sendo assim, a regeneração hepática é fundamental para o correto e intermitente funcionamento deste órgão, por um processo coordenado e regulado por diversos fatores, tais como o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e a insulina. Sabe-se que alguns microdomínios de membrana enriquecidos em colesterol, conhecidos como *lipid-rafts* (balsas lipídicas), desempenham um papel importante na sinalização metabólica mediada por insulina em adipócitos. No entanto, o papel dos *rafts* como reguladores dos efeitos metabólicos e mitogênicos da insulina no fígado e sua contribuição para o processo de regeneração hepática, ainda não foram investigados. Sendo assim, neste estudo, avaliamos a contribuição dos *lipid-rafts* nas respostas proliferativa e metabólica induzidas pela ativação do receptor para insulina (IR) no fígado. **Métodos:** O IR e os *lipid-rafts* foram imunomarcadas em células HepG2 e hepatócitos primários de rato. Para verificar a importância do colesterol membranar sobre a sinalização de cálcio (Ca^{+2}), proliferação celular e metabolismo induzidos por insulina, os *rafts* foram desfeitos através da incubação com Metil-beta-ciclodextrina. A depleção de colesterol *in vivo* foi realizada com administração intraperitoneal de lovastatina. No fígado, os sinais de Ca^{+2} induzidos pela insulina foram avaliados por exposição do órgão e visualização dos hepatócitos em microscópio confocal. O processo proliferativo do fígado foi avaliado pela regeneração hepática após hepatectomia parcial de 70%. **Resultados:** Observou-se que nas células hepáticas, uma subpopulação do IR está localizada em microdomínios de membrana enriquecidos em colesterol. A depleção do colesterol resultou na redistribuição desse receptor ao longo da célula hepática e na redução da sinalização de Ca^{+2} estimulada pela insulina. Além disso, a depleção do colesterol diminuiu a proliferação celular induzida por insulina, por um mecanismo dependente de ERK 1/2 e resultou em uma captação reduzida de glicose induzida pela insulina devido pelo menos em parte, a um comprometimento na ativação da via da Akt. *In vivo*, a redução do colesterol também causou um decremento na sinalização de Ca^{+2} desencadeada pela insulina no fígado, com conseqüente retardo da regeneração hepática após hepatectomia parcial. **Conclusão:** O colesterol de membrana e as balsas lipídicas em células hepáticas são essenciais para os efeitos metabólicos e proliferativos da insulina no fígado.

Palavras-chave: *lipid-rafts*, insulina, sinalização de Ca^{+2} , regeneração hepática.

ABSTRACT

Background & Aims: Liver regeneration is a well-coordinated process regulated by many growth factors including insulin. It is known that cholesterol enriched membrane microdomains, known as lipid rafts, play an important role in insulin-mediated cell signaling. However, the role of rafts as regulators of insulin signaling in the liver and hepatic regeneration have not been investigated yet. In this study, we investigated the contribution of the lipid rafts for the hepatic metabolic and mitogenic effects of the insulin. **Methods:** Insulin receptor (IR) and lipid-rafts were immunolabeled in HepG2 cells and primary rat hepatocytes. To check the effects of lipid-rafts on insulin signaling, membrane cholesterol was depleted *in vitro* with Methyl-beta-cyclodextrine (M β CD) and *in vivo* with lovastatin. Insulin-induced Ca²⁺ signals studies were performed in whole liver by intravital confocal imaging. Liver regeneration was evaluated with 70% partial hepatectomy. **Results:** We observed that a subpopulation of IR is found in membrane microdomains enriched in cholesterol on both HepG2 and hepatocytes. Cholesterol depletion with M β CD resulted in reorganization and redistribution of the IR along the cell as well as abolishment of insulin-induced nuclear and cytosolic Ca²⁺ signaling. In addition, cholesterol removal led to ERK 1/2 hyperphosphorylation and impaired HepG2 proliferation induced by insulin. There was also a reduction of glucose uptake, probably due to an impaired AKT phosphorylation. *In vivo* cholesterol depletion with lovastatin led to a disruption of the lipid rafts and a decrement in the insulin-induced Ca²⁺ signaling, imaged *in vivo* in the liver, that delayed liver regeneration after of partial hepatectomy.

Conclusions: Membrane cholesterol and lipid rafts are essential for the metabolic and proliferative effects of insulin in the liver.

Keywords: liver regeneration, lipid-raft, insulin signaling.

1. INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1 A membrana celular e os *lipid-rafts*

O modelo do mosaico fluido proposto por Singer e Nicholson em 1972 persiste como um grande dogma da biologia com o intuito de explicar como a membrana celular é organizada (Singer e Nicholson, 1972), (FIGURA 1). De acordo com este modelo, a bicamada lipídica funciona como um solvente neutro bidimensional tendo pouca influência no funcionamento das proteínas integrais ou periféricas que estão presentes ao longo do plasmalema. Contudo, nos últimos anos, descobertas biofísicas têm sugerido que uma mesma membrana celular apresenta diferentes fases de fluidez e organização devido a diferenças na composição de acordo com a região membranar analisada (Simons e van Meer, 1988), sugerindo modificações no modelo proposto em 1972.

Um marco importante no estudo de biomembranas foi a formulação da hipótese dos *lipid-rafts* (balsas de membrana) entre as décadas de 1980 – 1990 (Simons e van Meer, 1988; Brown e London, 1988; Simons e Ikonen, 1997). Estes microdomínios de membrana são caracterizados como estruturas pequenas e altamente dinâmicas, contendo uma alta concentração de esfingolipídios e colesterol, insolúveis no detergente Triton X-100 a 4°C (revisado por Lingwood, 2009). A grande maioria dos esfingolipídios encontrados nas balsas de membrana apresenta caudas de ácidos graxos predominantemente saturadas, o que possibilita uma interação forte e intercalada com moléculas de colesterol, fazendo com que essas regiões apresentem um grau de fluidez menor do que a membrana celular adjacente, que é constituída principalmente por fosfolipídios de cadeia insaturada (revisado por Simons e Toomre, 2000) (FIGURA 2). Em virtude do seu elevado conteúdo lipídico, esses complexos insolúveis em detergentes flutuam para uma região de baixa densidade durante centrifugação por gradiente de densidade, fato que possibilita a separação de proteínas associadas às balsas lipídicas (Simons & Ikonen, 1997).

A distribuição e a quantidade das balsas de membrana na superfície celular dependem do tipo de célula analisada. Um exemplo interessante é o acúmulo dessas estruturas na região apical de células epiteliais polarizadas e na membrana axonal de células neuronais, respectivamente (Simons e Ikonen, 1997). Por outro lado, em linfócitos e fibroblastos, células sem polaridade aparente, os *lipid-rafts* são encontrados por toda superfície celular (Renkonen, 1971; Levis e Evangelatos, 1976). Além da membrana citoplasmática,

existem evidências de que esse microdomínios de membrana podem também ser encontrados em organelas membranosas citoplasmáticas, como lisossomos, complexo de Golgi e retículos endoplasmáticos (van Meer, 1989).

Um subconjunto de balsas lipídicas é encontrado em invaginações da superfície celular e são chamadas de cavéolas. Estas estruturas foram identificadas pela primeira vez com base em sua morfologia, na década de 1950 (Palade, 1953; Yamada, 1955). As cavéolas são formadas em microdomínios ricos em colesterol através da polimerização de caveolinas (Cav) – proteínas integrais palmitoladas de membrana que interagem fortemente com o colesterol (Parton, 1996).

A título funcional, os *lipid-rafts* ancoram diversas proteínas envolvidas com transporte membranar, transdução de sinais e adesão celular, sendo esta uma de suas funções mais marcantes quando falamos de sinalização celular (Simons e van Meer, 1988; Brown e Rose, 1992; Simons e Ikonen, 1997). Entre as proteínas que podem se associar às plataformas lipídicas, citamos, por exemplo, proteínas com âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e tirosinas cinases da família *Steroid Receptor Coactivator* (Src) (Simons & Ikonen, 1997). Até hoje, mais de 200 proteínas foram descritas como associadas preferencialmente em regiões de *rafts* (Foster, 2003), inclusive o receptor para insulina (IR) (Morino-Koga, 2013).

Está bem estabelecido que, no caso da sinalização por receptores do tipo tirosina cinase (RTK), como o IR, proteínas adaptadoras e enzimáticas são recrutadas para o lado citoplasmático da membrana plasmática como resultado da ativação do ligante (revisado por Hunter, 2000). Sendo assim, uma forma de considerarmos os *rafts* como facilitadores da sinalização celular, baseia-se no fato de estas estruturas formarem plataformas de concentração para unidades de receptores. Se a ativação do receptor ocorrer em uma balsa lipídica, o complexo de sinalização é protegido de enzimas que não se localizam em *rafts*, tais como fosfatases de membrana, que poderiam afetar o processo de sinalização. Em geral, a sinalização em uma balsa lipídica recruta proteínas para um novo microambiente membranar, onde o estado de fosforilação pode ser modificado por cinases e fosfatases locais, levando a sinalização para níveis intracelulares, evento este representado durante a sinalização via receptores para imunoglobulinas, Fcs. (FIGURA 3).

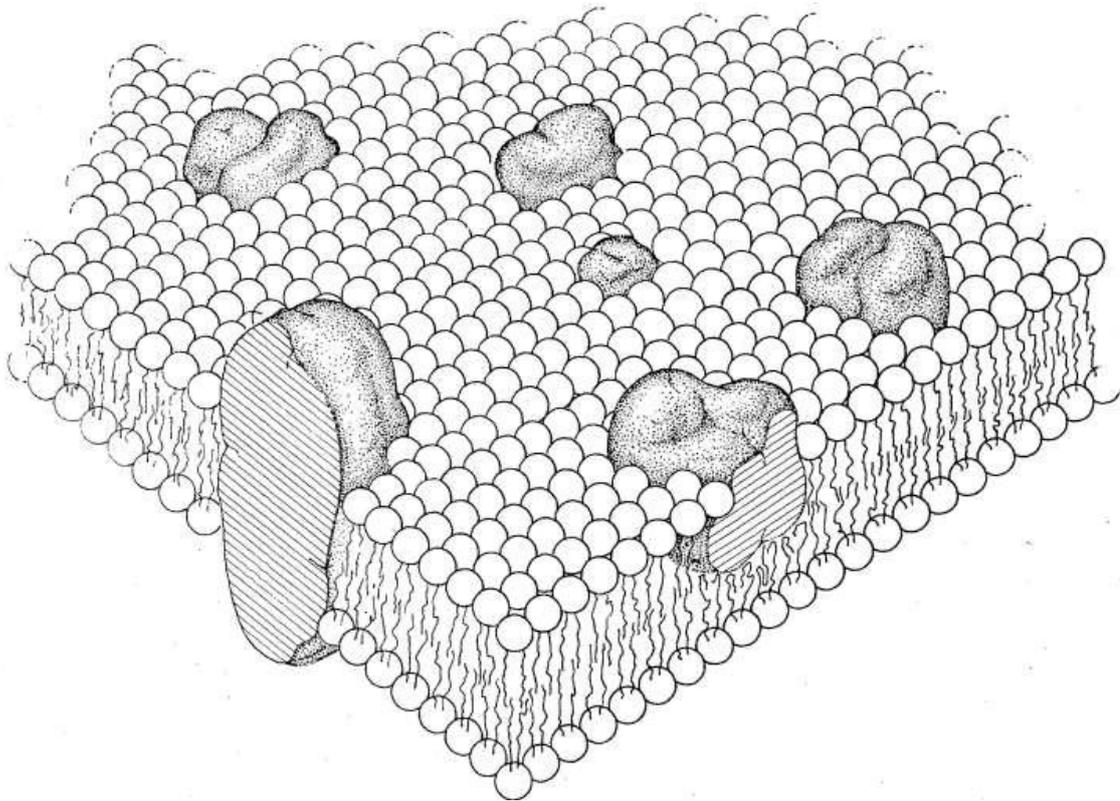


FIGURA 1: Modelo do mosaico fluido de Singer e Nicholson. Nesta imagem estão representadas proteínas integrais e periféricas (estruturas globulares) imersas em uma matriz lipídica. Dada a mobilidade das proteínas nessa matriz, elas podem formar alguns agregados. Ref: Singer e Nicholson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science*, 1972.

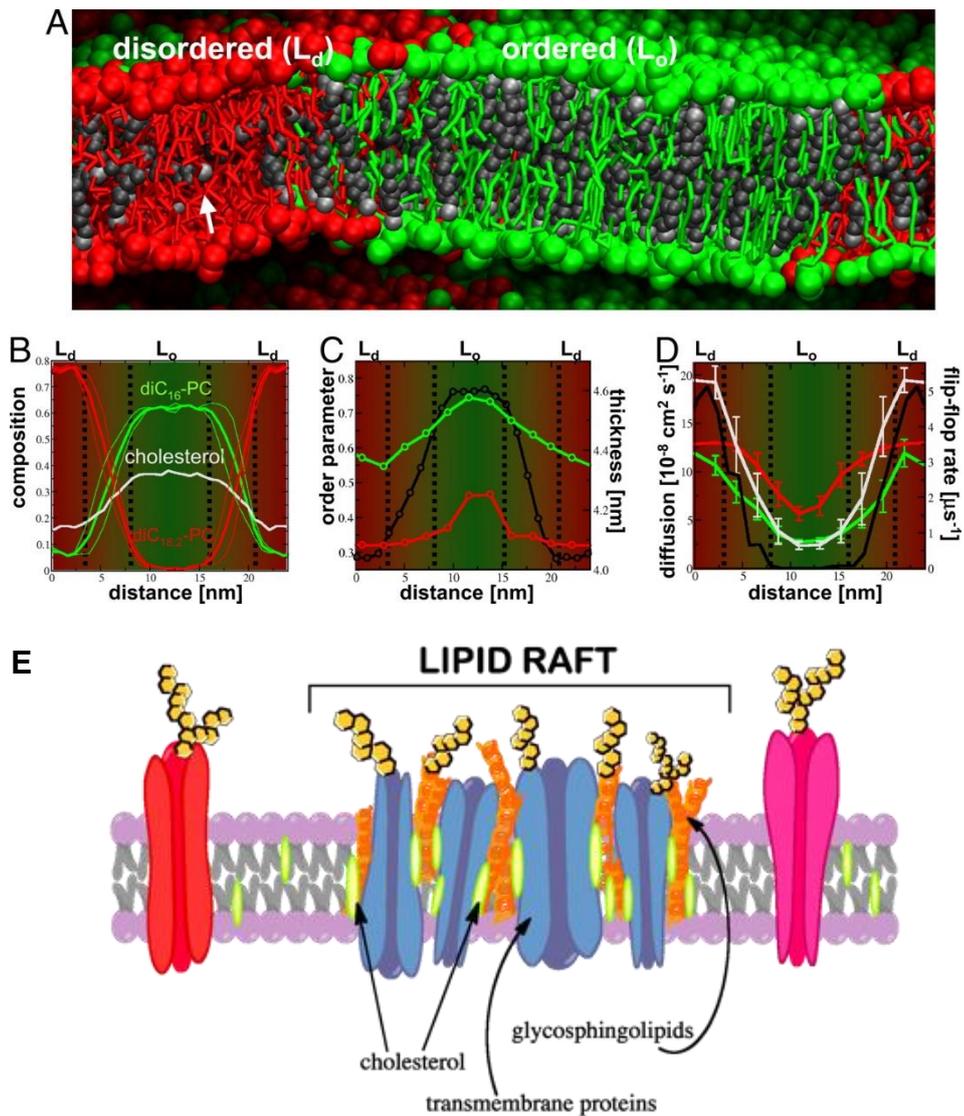


FIGURA 2: Propriedades estruturais e dinâmicas da membrana celular em um modelo computacional e organização dos *lipid-rafts*. (A) Vista lateral revelando a organização molecular nas fases ordenada (L_o) e desordenada (L_d) da membrana. A seta branca aponta para uma molécula de colesterol orientada entre os folhetos de cada monocamada. (B-D). Algumas propriedades da membrana ao longo da direção perpendicular entre cada uma das fases. A fase L_o é mostrada centralmente em verde, flanqueada por 2 metades periódicas do domínio L_d . Uma zona de transição que separa as 2 fases é indicada por linhas pretas tracejadas. Verde, vermelho e cinza são usados para distinguir propriedades de três moléculas da membrana: dipalmitol-fosfatidilcolina (diC₁₆-PC, lipídio saturado), dilinoleil-fosfatidilcolina (diC_{18:2}-PC, lipídio insaturado) e colesterol. (B) Composição da membrana expressa como uma fracção molar de cada um dos 3 componentes. Linhas finas representam as 2 monocamadas separadamente; A linha mais espessa representa a média. (C) Parâmetro médio de ordem de cauda para os lipídios fosfatidilcolínicos (eixo esquerdo) e espessura da membrana (curva preta, eixo direito). (D) Taxa de difusão lateral lipídica (eixo esquerdo) e taxa de *flip-flop* dos lipídios da membrana (curva preta, eixo direito). (E) Modelo esquemático da organização de um *raft* na membrana celular. Ref: Risselada e Marrink, *The molecular face of lipid-rafts in model membranes*. PNAS, 2008.

Sinalização do receptor FcεRI

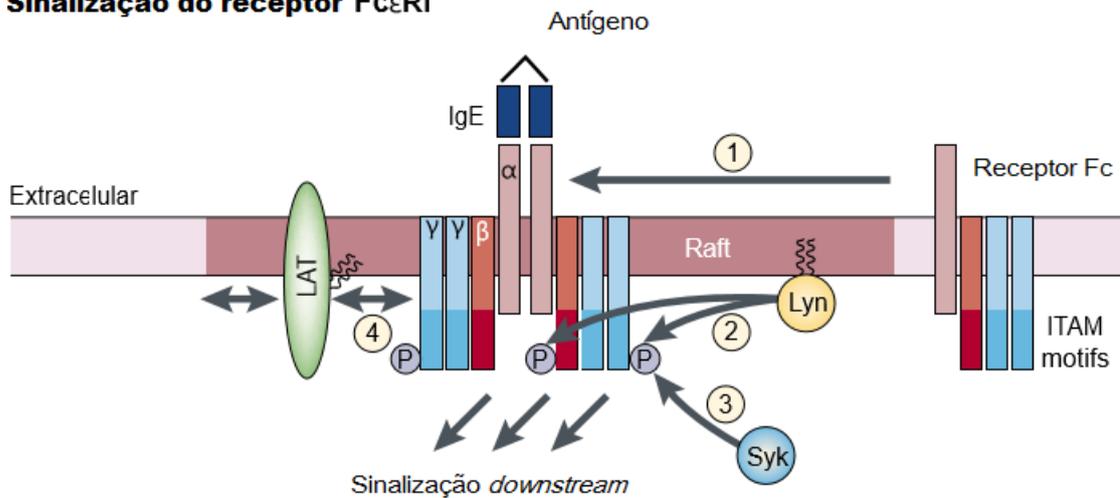


FIGURA 3: Sinalização através do receptor para imunoglobulina (Fc) em *lipid-rafts*. Uma sequência provável dos eventos iniciais é indicada numericamente. (1) A dimerização do receptor Fc, induzida por ligante, provavelmente aumenta a sua associação em um *raft*, o que leva a (2) fosforilação dos motivos de ativação de tirosina do receptor imune (ITAMs), por proteína tirosina cinases da família Src (por exemplo, Lyn, Lck e Fyn). (3) Os ITAMs fosforilados atuam como um local de ancoragem de membranas para Syk; Estas são também tirosina-cinases e são ativadas na balsa pela fosforilação da tirosina. (4) Syk / ZAP-70 pode, por sua vez, ativar outras proteínas tais como LAT, um adaptador associado a *raft*. Através de ligação cruzada, LAT pode recrutar outras proteínas para este microdomínio e amplificar ainda mais o sinal. A cascata complexa de eventos de sinalização descendentes posteriores não é mostrada. Modificado a partir de: Ref: Simons e Toomre. *Lipid-rafts and signal transduction. Nature Reviews*, 2000.

1.2 A sinalização celular mediada por insulina

A insulina, hormônio peptídico isolado pela primeira vez em 1922 por Banting e Best (Banting e Best, 1922), apresenta diversas funções fisiológicas, como, por exemplo, a homeostase de glicose (Banting e Best, 1922). As ações da insulina são mediadas por seu receptor do tipo tirosina cinase (RTK) (Saltiel e Kahn, 2001) encontrado em diversos organismos, dos mais primitivos como cnidários e insetos, até os mais derivados, como os vertebrados (Ward e Lawrence, 2009).

O IR é composto de duas subunidades α , extracelulares, e duas subunidades β , transmembranares (De Meytis E Whittaker, 2002). As subunidades α possuem atividade de ligação à insulina enquanto que as subunidades β possuem atividade enzimática intrínseca tirosina-cinase (FIGURA 4). A ligação da molécula de insulina à subunidade α de seu receptor ativa sua atividade tirosina-cinase e resulta na fosforilação da subunidade β e de diversos substratos protéicos endógenos intracelulares. Estes substratos incluem proteínas como a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e a fosfolipase C (PLC) (Eicchorn, 2001). A PLC, por sua vez, hidrolisa o lipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), gerando dois produtos intracelulares: inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP₃), um segundo mensageiro universal mobilizador de estoques intracelulares de Ca⁺², e diacilglicerol (DAG), um ativador da proteína cinase C (PKC), (FIGURA 5).

No fígado, a insulina regula tanto funções metabólicas (Saltiel e Kahn, 2001) quanto proliferativas (Motoo, 1988; Koontz e Iwahashi, 1981 e Amaya, 2014). As ações metabólicas da insulina no fígado são amplamente mediadas pela via PI3K- alpha serine/treonine kinase (Akt) / proteína quinase B (PKB). Akt é ativada na membrana plasmática após sua fosforilação mediada por PI3K induzida pelo IR, tendo como uma das ações finais a exocitose do transportador de glicose para a membrana plasmática (Taniguchi, 2007). Com relação ao papel mitogênico da insulina, estudos demonstram sua importância na proliferação de linhagens celulares de hepatoblastoma, por aumentar o número de células em cultura, síntese de DNA e secreção de α -fetoproteína (Motoo, 1988). Sabe-se também que, a ligação da insulina em seu receptor pode levar a ativação da via das *mitogen-activating protein* kinases (MAPKs) e consequente fosforilação das *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2), gerando maior transcrição de genes relacionados com a progressão no ciclo celular (Denton e Tavaré, 1995) (FIGURA 6). Além disso, estudos recentes de nosso grupo demonstraram que 1) o IR tem papel crucial

na regeneração hepática e 2) uma vez reduzida a síntese de Cav-1 (proteína envolvida na formação das cavéolas, um subtipo de *lipid-raft*) em hepatócitos, a proliferação destas células é reduzida assim como a internalização dos IRs (Amaya, 2014). Além disso, estudos sugerem que a remoção do colesterol de membrana leva à desorganização dos *rafts* e interfere com a sinalização de insulina, sendo uma das possíveis causas da resistência à insulina (Parpal, 2001). Em complementariedade, já foi demonstrado que alterações na composição de esteroides da membrana celular em pré-adipócitos 3T3-L1 foram acompanhadas por ruptura das balsas lipídicas, com redistribuição de caveolina-1, diminuição da ativação de Akt e inibição do transporte de glicose estimulado pela insulina. Sendo assim, os *lipid-rafts* podem vir a desempenhar um papel fundamental para os efeitos metabólicos da insulina; pouco, porém, se sabe de sua interferência em seus efeitos proliferativos. Contudo, um trabalho de Li, 2006, mostrou que algumas linhagens de câncer de mama e próstata apresentam alto conteúdo de *rafts* de membrana e que a remoção do colesterol de membrana resultou em diminuição da proliferação e viabilidade celular (Li, 2006). Além disso, células HepG2 de hepatocarcinoma humano apresentaram grande taxa de migração e proliferação devido à expressão aumentada de *toll-like receptor 7* e sua aglomeração nos *rafts* de membrana (Liu, 2016). Sendo assim, é sugerida a participação dos *rafts* na sinalização de insulina e na proliferação celular. Porém, até o presente momento, ainda não foi demonstrado qual o papel destes microdomínios de membrana na atividade metabólica e proliferativa induzida pela insulina em células hepáticas, muito menos qual a importância da interação entre IR e *rafts* para a regeneração hepática, tópico discutido logo a seguir.

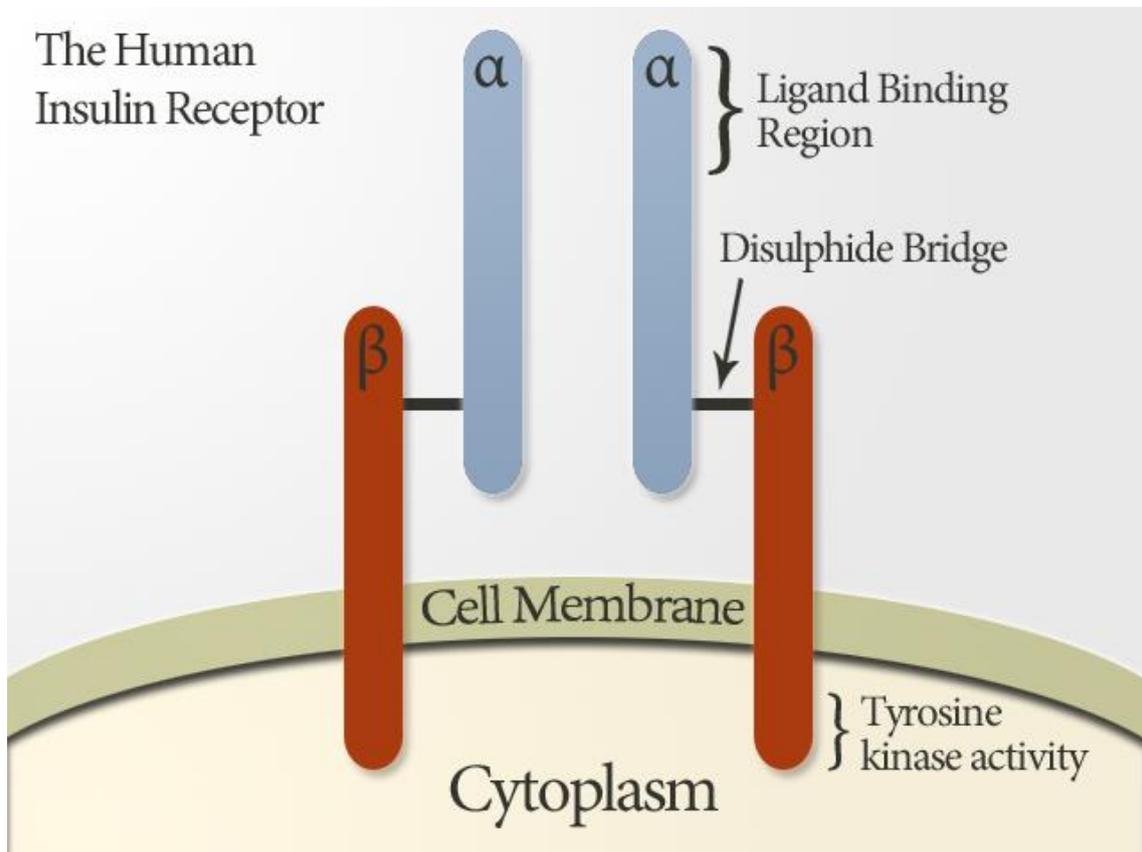


FIGURA 4: Modelo esquemático do receptor para insulina. Nesta imagem está representado o receptor para insulina, composto de um dímero, cada um com um domínio de ligação a insulina (subunidade α , azul) e dois domínios transmembranares com atividade de tirosina-quinase (subunidades β , vermelho). As subunidades α e β são unidas por uma ponte dissulfeto. Ref: <http://vetsci.co.uk/2011/04/22/development-of-insulin-resistance/>, acessado em 26/12/2016.

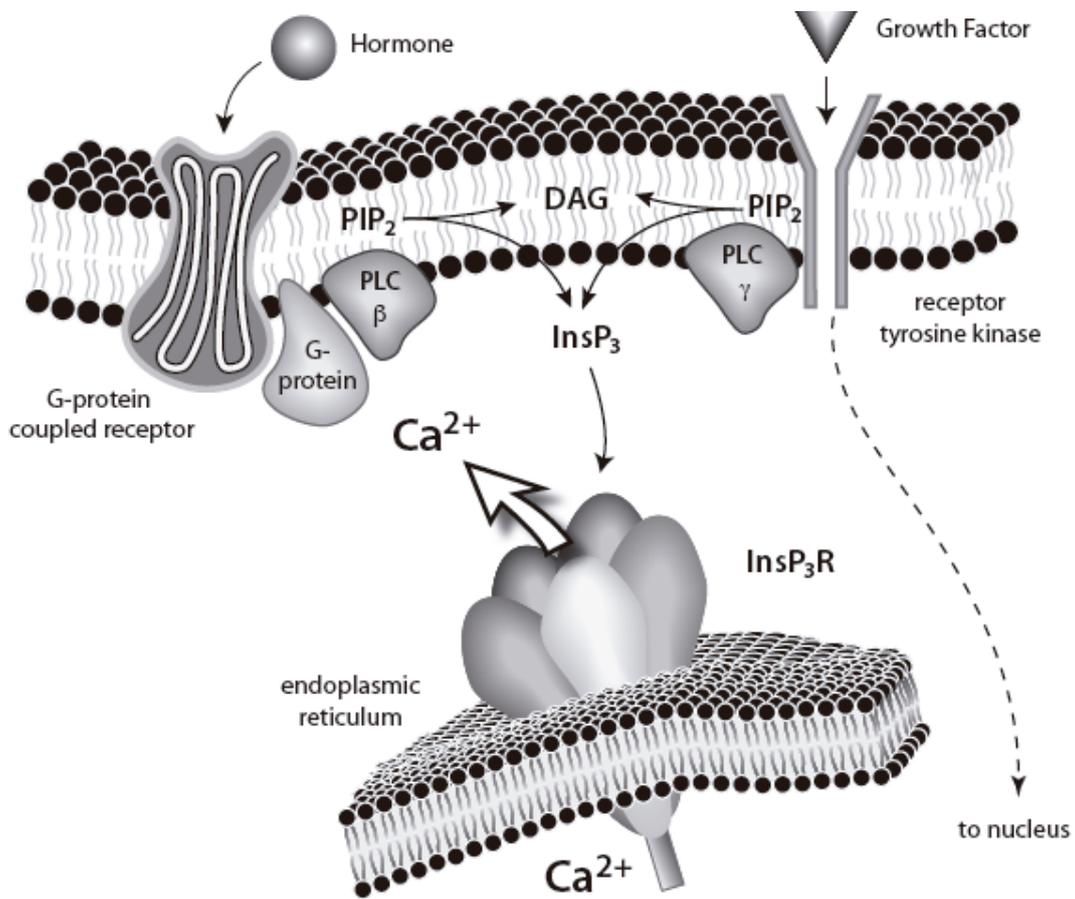


Figura 5: Mecanismos de sinalização de Ca²⁺ ativada por receptores tirosina cinase ou acoplados à proteína G. Após a ligação de um ligante em um receptor acoplado à proteína G ou ao receptor RTK, como no caso da insulina, ocorre a hidrólise do PIP₂ pela PLC, gerando DAG e InsP₃. O InsP₃ liga-se ao seu receptor InsP₃R no retículo endoplasmático que age como canal que permite a liberação de Ca²⁺ para o citosol. *Ref: Leite, MF et.al, 2010 – The Liver: Biology and Pathobiology; John Wiley and Sons).*

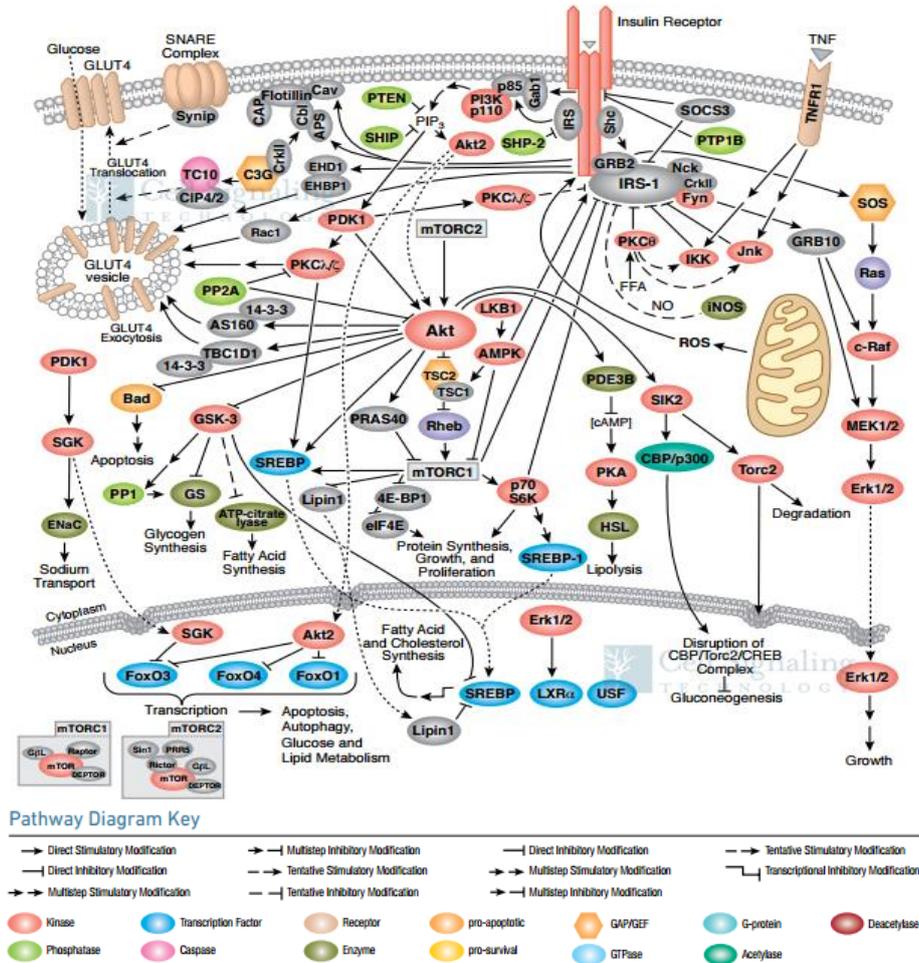


Figura 6: Vias de sinalização do receptor para insulina. A insulina é o principal hormônio que controla funções críticas de energia, como o metabolismo de glicose e lipídios. A insulina ativa o receptor de insulina tirosina quinase (IR), que fosforila e recruta diferentes adaptadores de substrato tais como a família de proteínas IRS. O IRS tirosina-fosforilado exibe então sítios de ligação para numerosos parceiros de sinalização. Entre eles, PI3K tem um papel importante na função da insulina, principalmente através da ativação das cascatas Akt / PKB e PKC ζ . A Akt ativada induz a síntese de glicogênio através da inibição de GSK-3; síntese de proteínas via mTOR e elementos *downstream*; e sobrevivência celular através da inibição de vários agentes pró-apoptóticos (Fatores de transcrição Bad, FoxO, GSK-3 e MST1). Akt fosforila e inibe diretamente os fatores de transcrição FoxO, que também regulam o metabolismo e a autofagia. Inversamente, sabe-se que a AMPK regula diretamente FoxO3 e ativa a atividade transcricional. A sinalização da insulina desencadeia efeitos mitogênicos, que são mediados pela cascata de Akt, bem como pela ativação da via Ras / MAPK. A via de sinalização da insulina inibe a autofagia através da quinase ULK1, que é inibida por Akt e mTORC1, e ativada por AMPK. A insulina estimula a captação de glicose no músculo e adipócitos através da translocação de vesículas GLUT4 para a membrana plasmática. A translocação de GLUT4 envolve a via PI3K / Akt e a fosforilação mediada por IR de CAP, e a formação do complexo CAP: CBL: CRKII. Além disso, a sinalização da insulina inibe a gliconeogênese no fígado, através da interrupção da ligação CREB / CBP / mTORC2. A sinalização da insulina induz a síntese de ácidos graxos e colesterol através da regulação dos fatores de transcrição do SREBP. A sinalização da insulina também promove a síntese de ácidos graxos através da ativação de USF1 e LXR. Um sinal de feedback negativo emanando de Akt / PKB, PKC ζ , p70 S6K e das cascatas MAPK resulta na fosforilação de serina e inativação da sinalização IRS. (Diagrama construído por Cell Signaling Technology, 2003-2016).

1.3 A regeneração hepática

O fígado, maior órgão do corpo após a pele, apresenta alta capacidade regenerativa e funções complexas que intrigam a sociedade por séculos (Michalopoulos e DeFrances, 1997; Taub, 2004). O fígado recebe toda a circulação saindo do intestino delgado e a maior parte da circulação que deixa o intestino grosso, bem como o baço e o pâncreas, através da veia porta hepática. Sendo assim, sua localização "estratégica" e seus padrões únicos de expressão de genes e proteínas nos hepatócitos (as principais células funcionais do fígado), permitem que ele funcione como uma barreira de defesa bioquímica contra produtos químicos tóxicos que acessam o organismo pela via oral. Dada esta localização, o fígado é um órgão constantemente sujeito a lesões por enterotoxinas e/ou outras substâncias que entram no organismo pela via enteral, além de, claro, lesões causadas por agentes virais como os vírus das Hepatites A, B e C. Desta maneira, o estabelecimento de uma capacidade regenerativa constante e eficiente é de extrema importância para o bom funcionamento deste órgão.

O conceito de regeneração do fígado remonta à mitologia grega antiga com a lenda de Prometeu, titã que roubou o fogo divino de Zeus para o dar aos homens. Como castigo, Zeus prendeu Prometeu aos pés do monte Cáucaso onde, todos os dias, uma águia vinha bicar-lhe o fígado. Dada a capacidade regenerativa do órgão, a cada dia a ferida cicatrizava até que a águia retornava para novamente feri-lo. Há décadas a regeneração hepática é um modelo experimental amplamente estudado para compreender mecanismos que regulam a proliferação e sobrevivência de hepatócitos. Os mamíferos mantêm uma proporção constante entre o peso do fígado e o peso corporal. Em um estado de homeostase, os hepatócitos maduros e diferenciados estão quiescentes, com renovação mínima. Mediante um estímulo regenerativo, 95% dos hepatócitos sofrem divisão celular como manutenção concomitante de suas funções metabólicas (Michalopoulos e DeFrances, 1997) (FIGURA 8).

A regeneração hepática é um evento que envolve múltiplos processos celulares e uma interação complexa entre citocinas, hormônios e fatores de crescimento. Mais especificamente, a regeneração hepática pode ser dividida em três fases: (1) Iniciação; (2) Proliferação; e (3) Inibição. A resposta mitogênica divide-se em duas fases, primeiramente devido às citocinas que estimulam a transição G0-G1 e progressão até a fase S do ciclo celular (revisado por Fausto, 2000 e Tarlá, 2006). Um evento fundamental

para o início do processo regenerativo hepático é a degradação da matriz extracelular do órgão por diferentes proteases. Os fatores de crescimento eventualmente ligados à matriz do ambiente hepático incluem *hepatocyte growth factor* (HGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF) e *Tumor growth factor-beta* (TGF β) que necessitam ser liberados para estimular a mitose dos hepatócitos (Mohammed e Khokha, 2005) (FIGURA 8).

Após esse evento, outros fatores são cruciais para a continuidade do processo, dentre eles a insulina, que, no fígado, regula tanto a proliferação dos hepatócitos quanto seu metabolismo (Koonts e Iwahashi, 1981; Saltiel e Kahn, 2001; Amaya, 2014). Porém, o papel da insulina sobre os eventos mitogênicos do fígado durante a regeneração hepática ainda não são muito compreendidos. Um estudo recente de Tseng e colaboradores, 2011, demonstrou que a insulina desempenha um papel crucial durante a regeneração do fígado, uma vez que ratos com insuficiência na produção de insulina apresentaram uma menor regeneração global após lesão hepática induzida por ligadura da veia porta (Tseng, 2011). Além disso, nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a insulina é um importante agente mitogênico no fígado, exercendo o efeito indutor de proliferação através da geração de InsP₃ no núcleo, o que inicia um sinal de Ca⁺² essencial para a proliferação de células endoteliais hepáticas (SKHep) e regeneração do fígado após hepatectomia parcial (Amaya, 2014). Contudo, o papel do colesterol de membrana na sinalização de insulina e a importância da interação entre essas duas estruturas para a regeneração hepática ainda não foram elucidadas.

Sendo assim, este trabalho propôs avaliar a participação do colesterol de membrana na regulação da sinalização de insulina no fígado, e em especial, qual a importância da composição lipídica da membrana para a regeneração hepática. Compreender melhor os mecanismos envolvidos na regeneração hepática pode gerar dados promissores com o objetivo de aprimorar os cuidados envolvidos durante transplantes e outros procedimentos clínicos que buscam uma rápida e eficiente recuperação funcional do órgão.

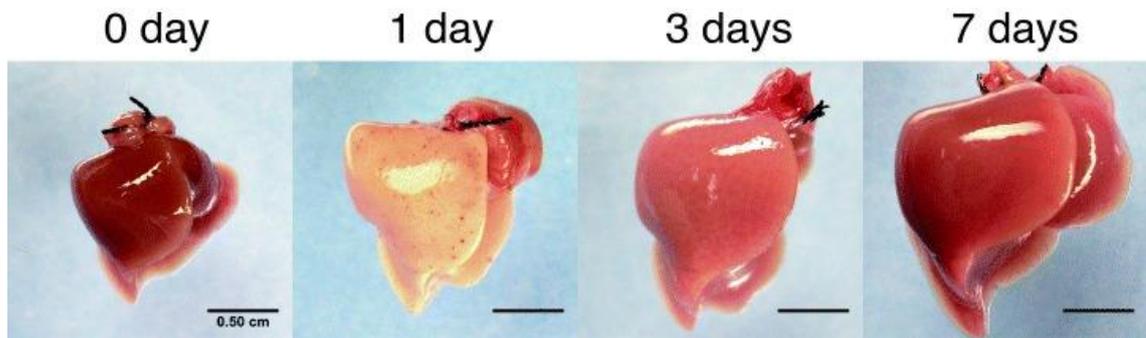


Figura 7: Regeneração hepática após hepatectomia parcial. Decurso temporal da regeneração hepática de camundongo após hepatectomia parcial. Esta série de fotos representa a regeneração hepática após hepatectomia parcial de 70%. Ref: Hata et al. *Liver development and regeneration: From laboratory study to clinical therapy. Development growth and regeneration*, 2007.

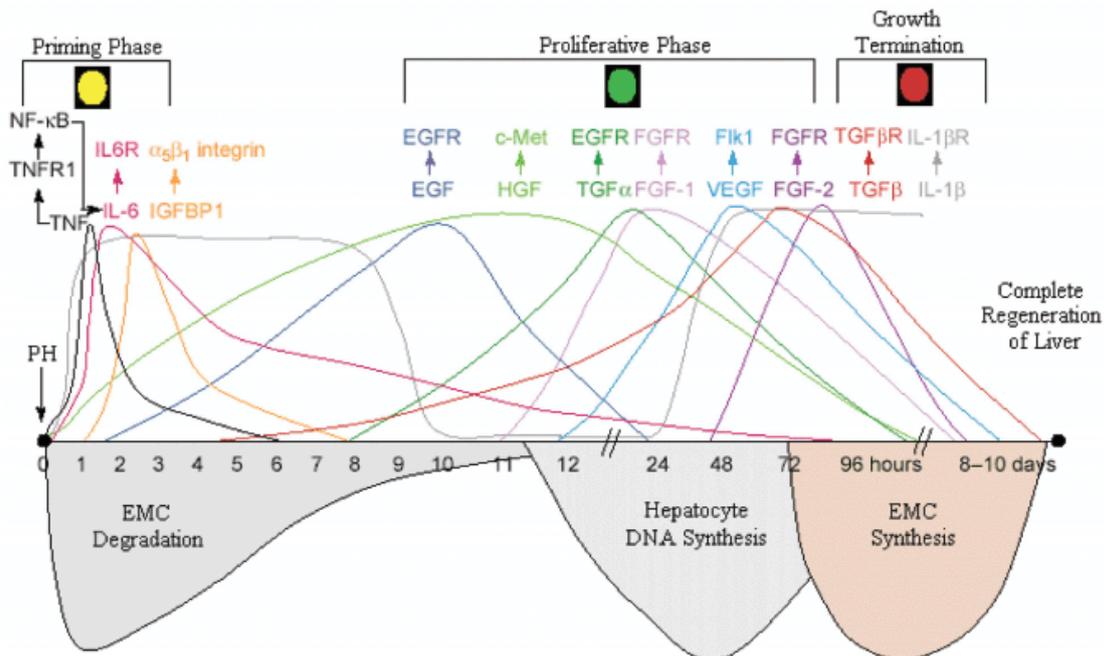


Figura 8: Eventos principais durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial.

Esquema dos sinais de iniciação e parada durante a regeneração hepática. A proliferação de hepatócitos durante a regeneração hepática envolve a indução inicial de citocinas da transição G0-G1 (luz amarela, *priming phase*), seguida pela progressão induzida por fatores de crescimento através do ponto de restrição G1 (luz verde, *proliferative phase*). A proliferação de hepatócitos é interrompida por fatores inibidores como TGF β e IL-1 β (luz vermelha, *growth termination*). Fatores tais como VEGF e FGF podem induzir a angiogênese após a proliferação. A degradação da matriz extracelular (ECM) ocorre nas primeiras horas antes da síntese e divisão do DNA do hepatócito e a matriz extracelular (ECM) hepática é reestabelecida após a divisão dos hepatócitos. Ref: Mohammed e Khokha. *Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. Trends in Cell Biology*, 2005.

2. OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a participação das balsas de membrana (*lipid-rafts*) em respostas celulares mediadas pela ação da insulina no fígado.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a localização membranar do IR em células hepáticas;
- Investigar a importância dos *rafts* de membrana na proliferação de células hepáticas e na resposta metabólica induzida pela insulina, assim como avaliar as vias de transdução de sinal envolvidas nestes processos celulares;
- Verificar a importância da composição lipídica da membrana na regeneração e sinalização de Ca^{+2} hepáticas induzida por insulina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

Todos os protocolos experimentais utilizando animais foram submetidos e aprovados ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) – UFMG, sob o número de protocolo: 169/2014.

3.2 Cultura celular

Duas linhagens celulares foram utilizadas neste estudo: hepatócitos primários de rato e linhagem HepG2 de hepatocarcinoma humano. Os hepatócitos foram isolados do fígado de ratos machos Wistar através da perfusão intraportal com colagenase, como já previamente descrito por Boyer, 1990. Após a extração, as células foram plaqueadas em lamínulas previamente revestidas por solução de colágeno de cauda de rato e mantidas em cultura por 4-6 horas em placa de 6-*wells* contendo meio William's, 10% de soro fetal bovino, 50 unidades/mL de penicilina e 50g/mL de estreptomicina. A placa foi mantida em estufa a 37°C sob 5% CO₂/95% O₂. A medida de viabilidade destas células para utilização foi feita através do teste de exclusão com azul de Tripán e somente foram utilizadas aquelas culturas com viabilidade acima de 85%.

As células HepG2 foram cultivadas a 37°C sob 5% CO₂/95% O₂ em meio DMEM HIGH GLUCOSE (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino, 50 unidades/mL de penicilina, 50g/mL de estreptomicina e 1mM de piruvato de sódio.

3.3 Remoção do colesterol de membrana com MβCD

Com o objetivo de sequestrar o colesterol de membrana e desorganizar os *lipid-rafts*, as células foram incubadas por 45 minutos em meio de cultura sem soro e contendo 10mM de Metil-Beta-Ciclodextrina (MβCD), (Klein, 1995; Christian, 1997; Rodrigues, 2013) ou 10mM de 2-Hidroxiopropil-γ-ciclodextrina (HYCD), como controle negativo.

3.4 Imunofluorescência

Para realização dos experimentos de imunofluorescência, as células foram cultivadas sobre lamínulas nas condições já descritas e marcadas para a observação das seguintes estruturas:

Lipid-rafts: Para realização da marcação dos *lipid-rafts* utilizamos a subunidade B da cólera-toxina acoplada ao fluoróforo Alexa-555 (CTxB-Alexa-555, Invitrogen, NY). As células vivas foram incubadas em meio de cultura contendo 1 ug/mL de CTxB-Alexa-555 e mantidas nesta situação por 20 minutos a 25°C. Após incubação, as células foram lavadas várias vezes com tampão salina com fosfato (PBS) 1X. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% a 25°C por 20 minutos. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio confocal Zeiss LSM 510 usando uma lente objetiva de 63X, NA 1.4 sendo as amostras excitadas a 568 nm e detectadas a LP 585 nm.

IR, EGFR e *c-met*: Após fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos, permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 por 15 minutos e bloqueadas com solução de PBS + 1% BSA + 5% de *Normal Horse Serum*, as células foram marcadas com anticorpo policlonal contra a subunidade β do IR (BD Biosciences, San Jose, CA), anti-EGFR (BD Biosciences, San Jose, CA) ou anti-*c-met* (Abcam) na concentração de (1:250), e, em seguida, incubadas com um anticorpo secundário conjugado com Alexa-488 (1:500), (Invitrogen, Grand Island, NY). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio confocal Zeiss LSM 510 usando uma lente objetiva de 63X, NA 1.4 sendo as amostras excitadas a 488 nm e detectadas a 505-550 nm.

Caveolina-1 (Cav-1): Amostras de fígado de animais controle ou tratados com lovastatina 15mg/kg/dia foram incluídos em Paraplast®, cortados em micrótomo na espessura de 5 μ m, desparafinizados com xilol, reidratados com etanol em concentrações decrescentes de 100 a 50% e pré-tratados com tampão Tris/EDTA (Tris (10 nmol/L); EDTA (1 mmol/L)) por 30 minutos a 100°C, para recuperação antigênica. Após recuperação dos epitopos, os cortes foram incubados com anti-Cav-1 (1:100) por 24 horas. Após sucessivas lavagens com PBS 1X, os cortes foram incubados com anticorpo secundário acoplado a Alexa -555 (1:500). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio confocal Zeiss LSM 510 usando uma lente objetiva de 63X, NA 1.4 sendo as amostras excitadas a 594 nm e detectadas a 610-710 nm.

3.5 Detecção dos sinais de Ca⁺²

Para detecção dos sinais de Ca^{+2} *in vitro*, as células foram carregadas com a sonda para Ca^{+2} FLUO-4/AM (6 μM) por 20 minutos a 37°C e 5% CO_2 . Em seguida, as lamínulas contendo as células foram transferidas para uma câmara de perfusão encaixada na platina do microscópio Zeiss LSM 510. Durante todo o experimento, as células foram tratadas com uma solução HEPES 1X (19,7mM Hepes, 130mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO_4 , KH_2PO_4 , 1,25mM CaCl_2 , 5mM glicose, Hepes 4,7mM), $\text{pH}=7,4$. O sinal nuclear e citosólico de Ca^{+2} foi monitorado em células individuais durante 4 minutos de estimulação com insulina (300 nM), vasopressina (100nM), EGF (50ng/mL) ou HGF (100ng/mL). A fluorescência (Fluo-4/AM) foi monitorada utilizando-se a objetiva de 63X (1,4 AN) e as imagens foram coletadas a 1-5 imagens/segundo. Alterações na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência inicial (F_0) e expressas como $(F/F_0) \times 100$ (Echevarría, 2003).

Já para a detecção dos sinais de Ca^{+2} *in vivo*, ratos Wistar machos foram anestesiados com quetamina/xilazina, tiveram o fígado exposto e incubado em uma placa contendo solução de Fluo-4/AM (50 μM) em salina por 10 minutos. Posteriormente, os animais foram cuidadosamente alocados sobre a platina de um confocal Nikon A1 com o fígado sobre uma lamínula e visualizado com objetiva de 10X. O sinal de Ca^{+2} foi monitorado por 5 minutos antes e após a injeção intravenosa de uma solução de 600nM de insulina e as alterações na fluorescência foram também normalizadas de acordo com a descrição acima.

3.6 Ensaio de incorporação de BrdU

A proliferação de células HepG2 foi mensurada pelo ensaio de incorporação de BrdU de acordo com instruções do fabricante (Roche Applied Science, IN). As células HepG2 foram plaqueadas em placa de 96-wells, carenciadas por 24 horas após aderidas e incubadas com solução contendo BrdU e diferentes concentrações de insulina (300, 600 e 1200nM) por 16 horas. As células tratadas com M β CD (10mM) ou HYCD (10mM) foram tratadas por 45 minutos antes de serem incubadas com insulina e BrdU.

3.7 Dosagem da glicose

Concentração de glicose no meio de cultura foi mensurada através do método colorimétrico enzimático (Analisa, Belo Horizonte, Brasil) de acordo com instruções do fabricante. Inicialmente, as células controle ou tratadas com M β CD (10mM) foram estimuladas com insulina (300nM) por 15 minutos e, então o meio de cultura foi coletado para o teste. 10 μ L do meio e da solução padrão (glicose a 100mg/dL) foram adicionados a 990 μ L de reagente de coloração (tampão fosfato pH 7,5, 5mM de fenol, 1000U/L de glicose-oxidase, 1000 U/L de peroxidase, 0,4mM de 4-aminoantipiridina, 7,7mM de azida de sódio). Os tubos foram incubados por 10 minutos a 37°C. A absorvância da solução foi mensurada a 480nm (UV/visible U-200L Spectrophotometer, Hitachinaka, Japan). A concentração de glicose foi calculada através da equação: (Concentração do padrão/ Absorbância do padrão) X Absorbância da amostra. A concentração de glicose foi plotada como porcentagem do controle.

3.8 Imunohistoquímica para PCNA

Secções embebidas em Paraplast® (Sigma-Aldrich) de tecido hepático de ratos após regeneração foram desparafinizados com xilol, reidratados com etanol em concentrações decrescentes de 100 a 50% e pré-tratados com tampão Tris/EDTA (Tris (10 nM); EDTA (1 mM)). Após recuperação dos epitopos, os cortes foram incubados por 30 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada, para bloqueio da peroxidase endógena. Após 3 lavagens com PBS 1X, os cortes foram incubados com anticorpo preparado em solução de bloqueio de ligações inespecíficas feito com BSA (1% w.v.) e *normal horse serum* (5% w.v.) em PBS (1X) por 1 hora. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* com *anti-proliferating cell nuclear antigen* (anti-PCNA) em PBS 1X (1:100), (Dako-Cytomation). Após sucessivas lavagens com PBS 1X, os cortes foram incubados por 30 minutos com *Biotinylated link universal* e, posteriormente, por mais 30 minutos com *Streptavidina-Horseradish Peroxidase* (HRP). Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB) por cerca de 2 minutos. Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água destilada corrente, desidratadas em bateria crescente de álcool 50-100% e diafanizadas em 2 imersões em xilol. As lâminas foram montadas em Entellan (Merck). Para análise, 5 campos de cada corte (5 cortes por animal, n=3 animais por grupo) foram utilizados para análise de positividade para PCNA (células positivas/número total de células X 100).

3.9 Western blot

Células cultivadas em placas de 6-wells foram lavadas com PBS e solubilizadas em 150 µl de solução detergente: Nonidet® P40 (1% w/v.) contendo 2% de inibidor de protease (Roche Applied Science). A concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Bradford. 30 µg de proteína foram separados em gel de poliacrilamida 8% e transferidos para membrana de PVDF (Bio Rad). As membranas foram bloqueadas com albumina bovina (5% w/v) diluída em tampão TBST (tampão salina: Tris base (20 mM) acrescido de 0,05% de Tween 20) por 1 hora e depois, incubadas com anticorpos primários: anticorpo policlonal anti-IR (1:1000); anticorpos policlonais anti-Cav1 (1:1000), anti-Akt e anti-pAkt (1:500) e anti-ERK1/2 e pERK1/2 (1:1000); ou anticorpo monoclonal ant-β-actina ou Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), (1:5000). Esta incubação ocorreu por 2 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com TBST, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:5000) à temperatura ambiente. As membranas lavadas foram expostas ao reagente de detecção ECL plus (GE Healthcare), 30 µl/cm² por 5 minutos e posteriormente revelados por quimioluminescência no revelador LAS-4000 (GE Healthcare).

3.10 Hepatectomia parcial e tratamento com lovastatina

Hepatectomia parcial de 70% foi realizada em ratos Wistar machos adultos, de acordo com protocolo descrito por Higgins, 1931. Os animais foram tratados com salina ou com 15mg/kg/dia de solução de lovastatina diluída em salina durante 14 dias antes do procedimento cirúrgico (Björkhem-Bergman, 2010). Após a cirurgia, os animais continuaram a receber o tratamento com lovastatina até o dia do sacrifício (48 ou 120 horas após a hepatectomia). Para avaliar a regeneração, o fígado de cada animal foi removido e pesado sendo corrigido pelo peso total do animal (razão peso do fígado/peso total do animal). Fígados de animais não hepatectomizados, porém submetidos ao estresse cirúrgico (*sham*), foram considerados como controle.

3.11 Dosagem de colesterol

A fim de quantificarmos o colesterol presente no tecido hepático de animais controle ou tratados com lovastatina, amostras de fígado foram coletadas durante hepatectomia e lisadas, por 1 hora e 30 minutos, a 4°C, sob leve agitação, em solução-tampão contendo TrisHCl (100 mM) (pH 8,0), NaCl (150 mM), MgCl₂ (2mM), Triton X-100 (1%), iodoacetamida (5mM), NaN₃ (0,025%), PMSF (1mM), diisopropilfluorofosphate (1mM) e 0,02 U/mL de aprotinina. Após a lise, uma pequena porção dos extratos teciduais de cada grupo foi coletada para extração de lipídios pelo método de Folch (Folch, 1957). Resumidamente, os extratos foram diluídos na razão (8:4:3) de clorofórmio: metanol: amostra. Após misturarmos os solventes e as amostras, os tubos permaneceram em repouso por 5 minutos. O próximo passo foi descartar a fase superior (aquosa) e secar a fase inferior (orgânica) com o auxílio de câmara à vácuo. Os lipídios secos foram, então, submetidos à quantificação de colesterol usando o *Cholesterol Quantitation Kit* (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante.

3.12 Ensaio de MTT

Inicialmente, 10⁴ células HepG2 foram plaqueadas em placas de 24-wells contendo 1 ml de DMEM +10 % de soro fetal bovino + 1% antibiótico e antimicótico. Após 24 horas, células foram incubadas por 45 minutos com DMEM sem soro, MβCD (10mM), HYCD (10mM) ou Triton (1% w/v.) como controle positivo. Em seguida, células foram lavadas com PBS e novamente incubadas com DMEM sem soro. Logo após, 50uL de solução de MTT (5mg/mL) foram adicionados a cada poço por 4 horas. Após a incubação, 40uL de solução de SDS/HCl a 4% foram adicionados em cada poço e placa foi incubada por 12 horas. A leitura foi feita em espectrofotômetro ajustado para absorvância a 595nm. Para cada condição, 4 leituras individuais foram realizadas.

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 O receptor para insulina está localizado nos *lipid-rafts*

Diversos trabalhos sugerem que as balsas de membrana desempenham um papel importante na transdução do sinal mediada pela ativação do IR (Parpal *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2001; Vainio *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2003). Neste aspecto, já foi também mostrado que estímulos elétricos de baixa intensidade (2V/cm, 55pps durante 10 minutos) promovem o acúmulo dos receptores para insulina nesses microdomínios de membrana, com consequente ativação das vias de sinalização descendentes (Morino-Koga, 2012). Contudo, ainda não foi demonstrada por imagem a localização dos IRs nos *rafts* de membrana. Com o objetivo de visualizar e confirmar a localização dos IRs nos *rafts* ricos em colesterol, realizamos a imunomarcagem tanto dos IRs quanto das balsas de membrana, estas últimas sendo visualizadas através da marcação por fluorescência para o gangliosídeo de membrana GM1 (marcador de microdomínios de membrana ricos em colesterol) (Kakio, 2001; Mori, 2012). Na FIGURA 9, podemos observar a proximidade dos IRs com as balsas de membrana tanto em células HepG2, (FIGURA 9A-B) quanto em hepatócitos primários de rato (FIGURA 9C-E). Utilizando microscopia de alta-resolução AiryScan, observamos a sobreposição perfeita do IR com os *lipid-rafts* na membrana celular dos hepatócitos primários (FIGURA 9D). Investigamos ainda se este perfil de localização celular dos IRs nas balsas de membrana ocorre também para receptores de outros mitógenos hepáticos. Assim, avaliamos se os receptores de EGF (EGFR) e HGF (*c-met*) estão também localizados nos *rafts*. Observamos que EGFR também se localiza nestes microdomínios ricos em colesterol, porém, o mesmo não foi observado para o receptor de HGF, *c-met* (FIGURA 9A, painéis centrais e inferiores). A quantificação dos picos de intensidade de fluorescência, que demonstram a colocalização das estruturas, estão representadas na FIGURA 9B para células HepG2 e em 9E para hepatócitos. Desta maneira, demonstramos que nas células hepáticas analisadas, o IR está localizado nos *lipid-rafts*.

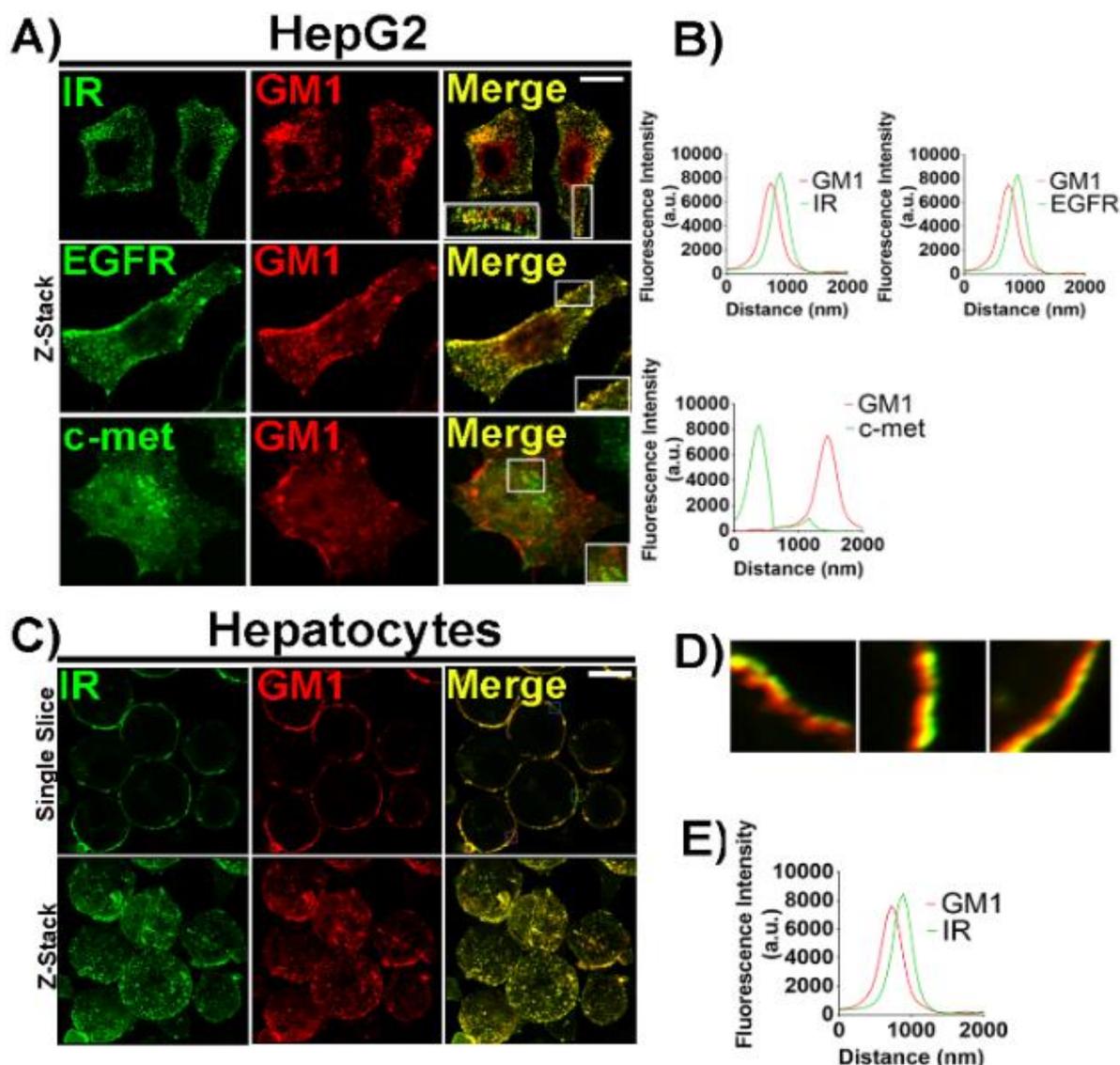


Figura 9: O receptor para insulina está localizado em microdomínios de membrana ricos

em colesterol. A) Imagens de microscopia confocal realizada em células HepG2 imunomarcadas em verde para o receptor para insulina (IR), EGFR ou *c-met* (painéis à esquerda) e em vermelho para o gangliosídeo GM1 (GM1, painel central). A sobreposição de ambas as marcações está representada no painel à direita. B) Quantificação da intensidade de fluorescência em uma região de interesse analisada nas imagens sobrepostas em A. Picos da curva demonstram a intensidade de fluorescência máxima em determinado ponto para as marcações de IR, EGFR e *c-met*. Sobreposição dos picos indicam colocalização de estruturas em verde e vermelho. C) Imagens de uma única fatia realizada por microscopia confocal realizada em hepatócitos primários de rato imunomarcados em verde para o receptor para insulina (IR, painel superior à esquerda), em vermelho para o gangliosídeo GM1 (GM1, painel superior central) e a sobreposição de ambas as marcações está representada no painel à direita. Painéis inferiores representam mesma marcação mencionada acima, porém as imagens representam a reconstrução de uma série-Z. D) Amplificações de regiões de interesse delimitadas no painel C e capturadas por microscopia de super-resolução AiryScan, realçando a colocalização entre IR e GM1. E) Quantificação da intensidade de fluorescência em uma região de interesse analisada na imagem sobreposta em C. n= 3 experimentos individuais e 55 células analisadas para cada marcação. Barra de escala = 10µM.

4.2 A remoção do colesterol de membrana redistribui o receptor para insulina nas células

Assim como outros receptores do tipo tirosina-cinase, a ligação da insulina a seu receptor específico irá, tipicamente, levar à dimerização do receptor e fosforilação dos resíduos de tirosina, o que desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que culminará com um evento fisiológico final (revisado por Zwick, 2001). Com o objetivo de verificar se a localização dos IRs nas balsas de membrana é essencial para a ativação do receptor e consequente transdução de sinal intracelular mediada pela insulina, realizamos a desorganização dos *rafts* através da remoção do colesterol de membrana. Uma metodologia bastante empregada e aceita para esse propósito, é a utilização de M β CD, uma ciclodextrina com um anel hidrofóbico que extrai o colesterol da membrana celular (Christian, 1997). Nagata e colaboradores, 2007, já demonstraram a eficiência do tratamento com essa ciclodextrina em células hepáticas para a desorganização dos microdomínios de membrana (Nagata, 2007). Na FIGURA 10A observamos a marcação fluorescente do gangliosídeo de membrana GM1, em células HepG2 controle (painel da esquerda) ou incubadas com M β CD (10mM) por 45 minutos (painel da direita). Como podemos observar, existe uma modificação no padrão da marcação, assim como uma redução e dispersão do sinal fluorescente, quantificado na FIGURA 10B, indicando que o tratamento com a ciclodextrina é eficiente na remoção do colesterol e desorganização dos *rafts* (Controle: $98,65 \pm 4$ a.u vs M β CD: $58,8 \pm 3,7$ a.u, $n=159$ células por grupo, * $p < 0,01$).

Para verificarmos se o tratamento com essa droga poderia levar à diminuição da viabilidade celular, realizamos o ensaio de MTT. Como mostrado, o tratamento com a droga não causa morte/inviabilidade metabólica celular, resultado representado na FIGURA 10C-D. Células não-tratadas, tratadas com M β CD (10mM) ou tratadas com HYCD (10mM), um análogo sem afinidade pelo colesterol, foram igualmente capazes de metabolizar o MTT em formazan, um indicativo da atividade mitocondrial e consequente viabilidade metabólica celular. Como controle negativo da técnica, foi utilizado a incubação das células com Triton a 1% antes da realização do ensaio (Controle: $100 \pm 0\%$; Triton (1%): $19,63 \pm 0,4\%$; M β CD: $97,41 \pm 2,3\%$; HYCD: $102,2 \pm 0,7\%$, $n=3$ experimentos individuais em triplicata, * $p < 0,01$). Sendo assim, o emprego do M β CD para desorganização dos *rafts* e estudo da interferência desse processo na atividade celular induzida pela insulina, se mostrou adequado.

Após o tratamento com M β CD e concomitante marcação fluorescente do IR, observamos que a disposição desta proteína ao longo da superfície celular é alterada tanto em células HepG2 quanto em hepatócitos (FIGURA 10E-H). Em células controle, o IR encontra-se distribuído ao longo de toda a membrana da célula, enquanto que nas células submetidas ao tratamento para remoção do colesterol e desorganização dos rafts, os receptores se reorganizam, mostrando-se aglutinados e não mais recobrimo todo o plasmalema (HepG2 - controle: 71 \pm 10% vs M β CD: 31 \pm 5% / Hepatócitos – controle: 73 \pm 12% vs M β CD: 22 \pm 7%; *p<0,05, n=55 células quantificadas para cada grupo e tratamento), (quantificação nas FIGURAS 10J-I). Para garantir que o tratamento para a remoção do colesterol causou um rearranjo na localização do receptor e não uma redução na densidade protéica total, realizamos *western blotting* com lisados de células HepG2 controle e tratadas. Como observado, a análise densitométrica demonstrou uma mesma abundância relativa do IR em ambos os grupos (Controle: 1,25 \pm 0,27 vs M β CD: 1,53 \pm 0,11, n=3 experimentos individuais em duplicata, p=ns), (FIGURA 10G).

Experimentos na literatura demonstraram que o tratamento com M β CD induz a exocitose e endocitose compensatória de vesículas intracelulares em fibroblastos e em neurônios motores (Hissa, 2012; Rodrigues, 2013). Ao considerarmos nosso modelo, tal evento poderia causar a internalização do IR. Para verificar se o tratamento com M β CD levaria a internalização do receptor, realizamos uma dupla marcação fluorescente para o IR e citoesqueleto de actina (marcado com *phalloidin*). Observamos que após o tratamento com M β CD, o receptor para insulina tende a se aglomerar em “*clusters*” intracelulares como mostrado na FIGURA 11.

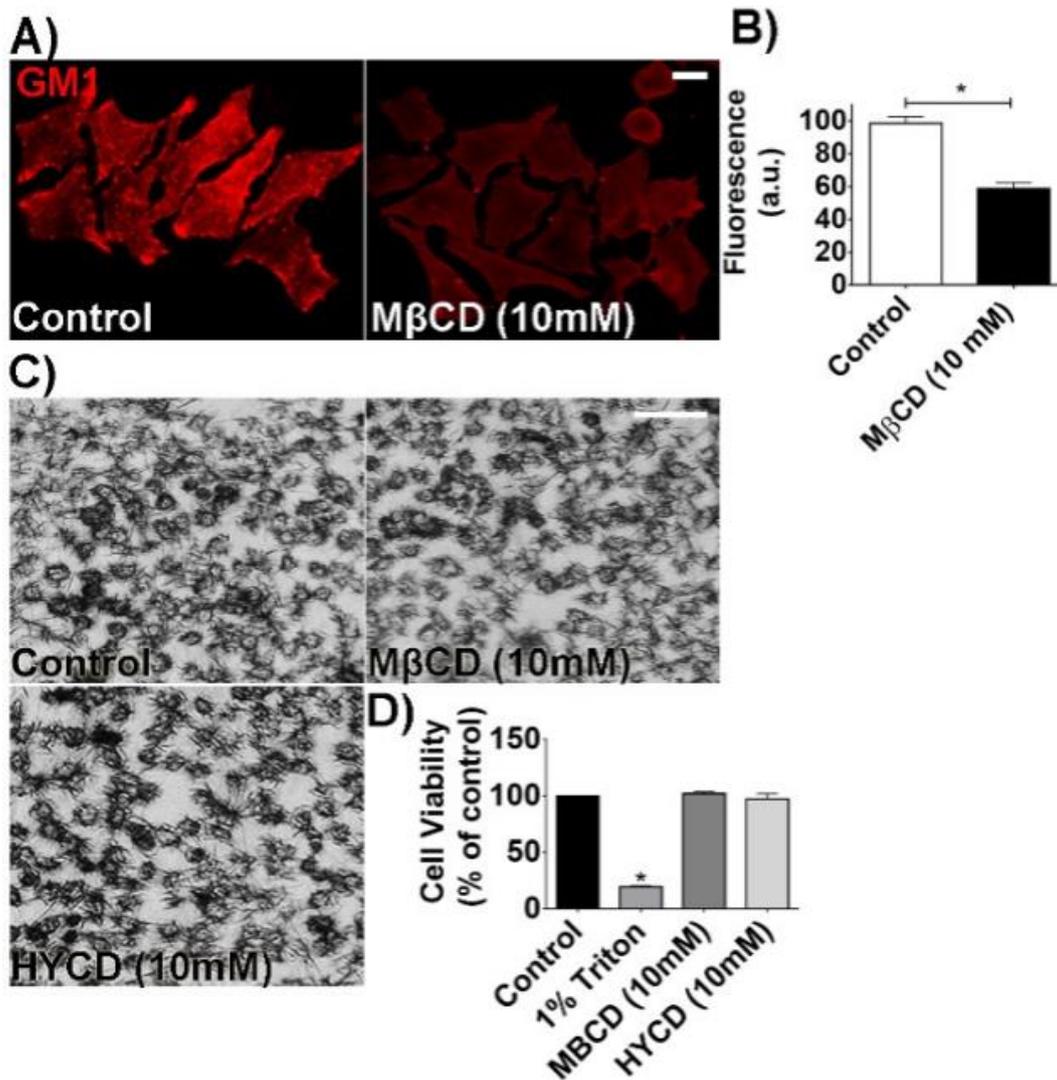


Figura 10: O tratamento com MβCD eficientemente desorganiza os *lipid-rafts* e a distribuição do receptor para insulina na célula. A) Imagens de células HepG2 controle ou tratadas com MβCD 10mM por 45 minutos e posteriormente marcadas com Cólera-Toxina-B (CTx-B) acoplada a Alexa 555. B) Quantificação da intensidade de fluorescência emitida pela CTx-B-555 (n=159 células por grupo, * p<0,01). C) Imagens representativas da atividade metabólica de HepG2, mensurada por MTT, controle, tratadas com MβCD 10mM e HYCD 10mM por 45 minutos. D) Quantificação do ensaio de MTT executado em C (n=3 experimentos individuais em triplicata, *p<0,05).

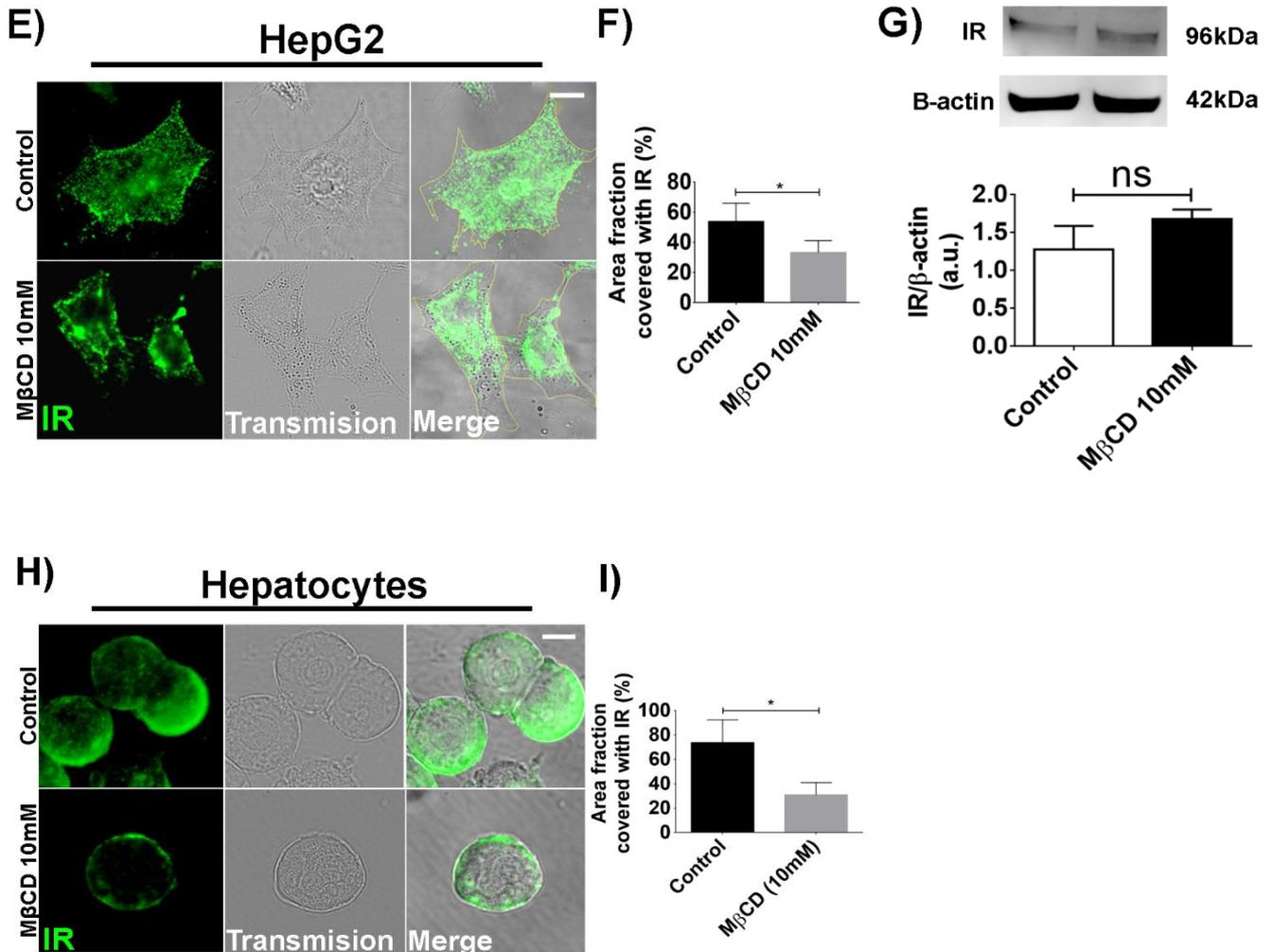


Figura 10 (continuação): **E)** Z-stack de células HepG2 controle e tratadas com MβCD 10mM e marcadas para o receptor para insulina. Observar no painel à esquerda contornada em amarelo, a área de membrana recoberta pelo receptor para insulina. **F)** Quantificação da área de membrana revestida pelo receptor para insulina nos dois grupos. **G)** *Imunoblottings* de extrato total de proteínas de células HepG2 controle e tratadas com MβCD (10mM) e análise densitométrica (gráfico abaixo), mostrando que o tratamento com a ciclodextrina não altera a quantidade do receptor para insulina ($p=ns$, $n=3$ experimentos individuais). **H)** Z-stack de hepatócitos de rato controle e tratados com MβCD (10mM) e marcadas para o receptor para insulina. **I)** Quantificação da área de membrana revestida pelo receptor para insulina em ambos os grupos. Valores representam a média \pm desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way ANOVA* ou *t-test student* (* $p<0,01$, $n=3$ experimentos em triplicata). Barra de escala superior painéis A,E,H = 10 μ M. Barra de escala painel C = 100 μ M.

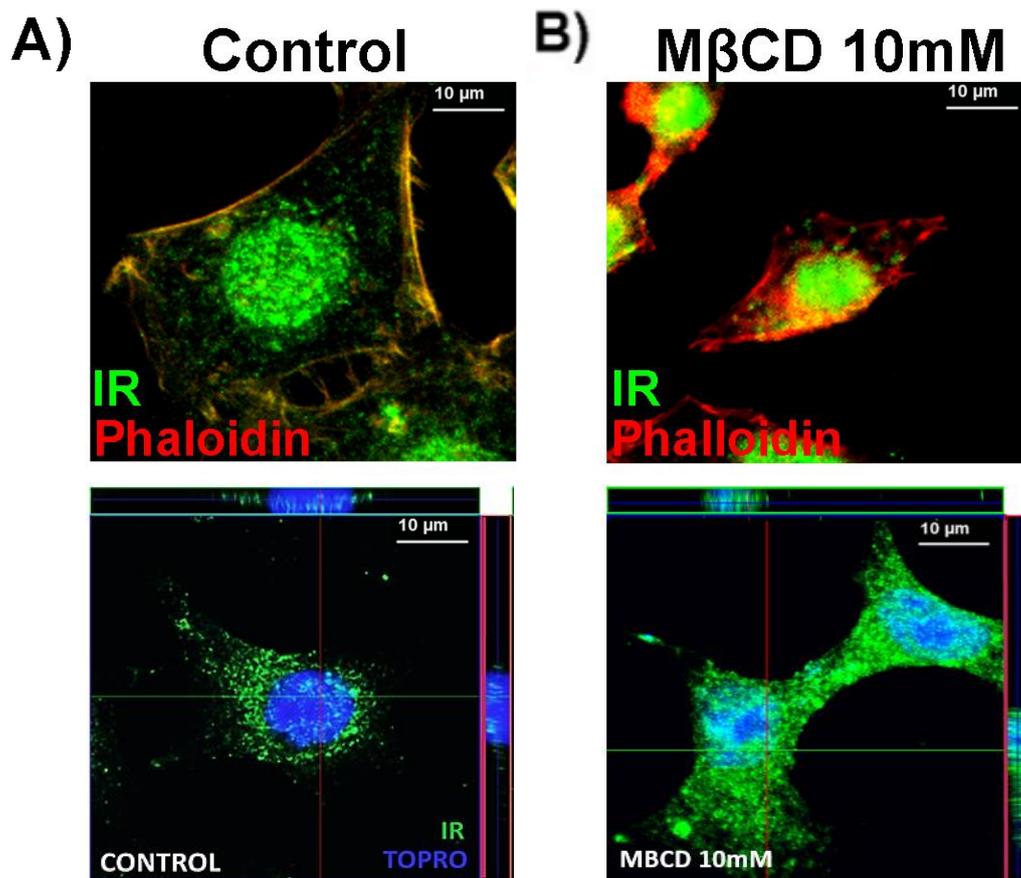


Figura 11: O tratamento com MβCD leva a internalização do receptor para insulina. A) Células HepG2 controle e B) tratadas com MβCD (10mM) e marcadas para o receptor para insulina em verde e para o citoesqueleto de actina em vermelho. Observar no painel à esquerda, a formação de “dots” logo abaixo do citoesqueleto, indicativo de internalização do receptor em vesículas intracelulares. Imagens inferiores mostram imagens ortogonais mostrando a internalização do receptor (n=3 experimentos em triplicata para cada condição).

4.3 A sinalização de Ca^{+2} induzida por insulina é dependente da integridade dos *lipid-rafts*

A insulina é um hormônio responsável pela regulação do metabolismo, viabilidade, crescimento e proliferação em hepatócitos primários e diversas linhagens de hepatomas (Michalopoulos e Pitot, 1975; Koontz, 1981). Trabalhos recentes de nosso grupo demonstraram que a insulina, uma vez ligada a seu receptor de membrana, é capaz de iniciar sinais intracelulares de Ca^{+2} que começam no núcleo celular e se propagam por todo citoplasma devido à geração preferencial de InsP_3 no núcleo (Rodrigues, 2008; Amaya, 2014). Com base nisso, nos propusemos a investigar se este sinal de Ca^{+2} gerado pela insulina sofreria interferência mediante a desorganização dos *rafts* de membrana, uma vez que o IR se mostrou localizado nestas estruturas. Observamos que as células HepG2 e os hepatócitos tratados com M β CD (10mM) demonstraram uma redução na amplitude do sinal para Ca^{+2} induzido por insulina (HepG2 – Núcleo controle =221,3%, Citosol controle=164%; $p<0,01$, $n = 50$ células para cada condição) / (Hepatócitos – Núcleo controle = 142,3%, Citosol controle=58%; $p<0,01$, $n = 50$ células para cada condição), (FIGURAS 12 e 13). Com isso, a integridade dos *lipid-rafts* se mostra necessária tanto para a correta distribuição e biodisponibilidade do IR ao longo da célula quanto para o desencadeamento do sinal intracelular de Ca^{+2} mediante a ligação da insulina.

Sabe-se que além da insulina, outros fatores tais como HGF e EGF são de extrema importância para a sinalização celular de Ca^{+2} no fígado e com grande participação no processo de regeneração hepática (Gomes, 2008; revisado por Michalopoulos, 2010). Para investigar se a desorganização dos *rafts* também poderia afetar a sinalização de Ca^{+2} induzida por EGF ou HGF, células HepG2 foram submetidas ao mesmo tratamento com M β CD (10mM) e posteriormente estimuladas com os fatores de crescimento mencionados. De forma curiosa, a desorganização dos *rafts* não afetou o sinal de Ca^{+2} induzido por EGF (Núcleo controle =552,3 \pm 18%, Citosol controle=444 \pm 11%; $p<0,01$, $n = 50$ células para cada condição) ou HGF (Núcleo controle =589,3 \pm 11%, Citosol controle=498 \pm 6%; $p<0,01$, $n = 50$ células para cada condição), mesmo estando EGFR localizado nos *rafts*, conforme demonstrado anteriormente na FIGURA 14.

Com isso, em nosso modelo, a sinalização de Ca^{+2} induzida por HGF e EGF se mantiveram íntegras em células tratadas com M β CD (10mM). Por outro lado, a

desorganização dos *rafts* induzida pela ciclodextrina aboliu a sinalização de Ca^{+2} induzida por insulina. Desta forma, apesar de tanto IRs quanto EGFRs estarem localizados nas balsas de membrana, IRs se apresentaram mais sensíveis à desorganização dos *rafts*, já que a sinalização de Ca^{+2} induzida por insulina, mas não por EGF, foi completamente abolida em células tratadas com M β CD.

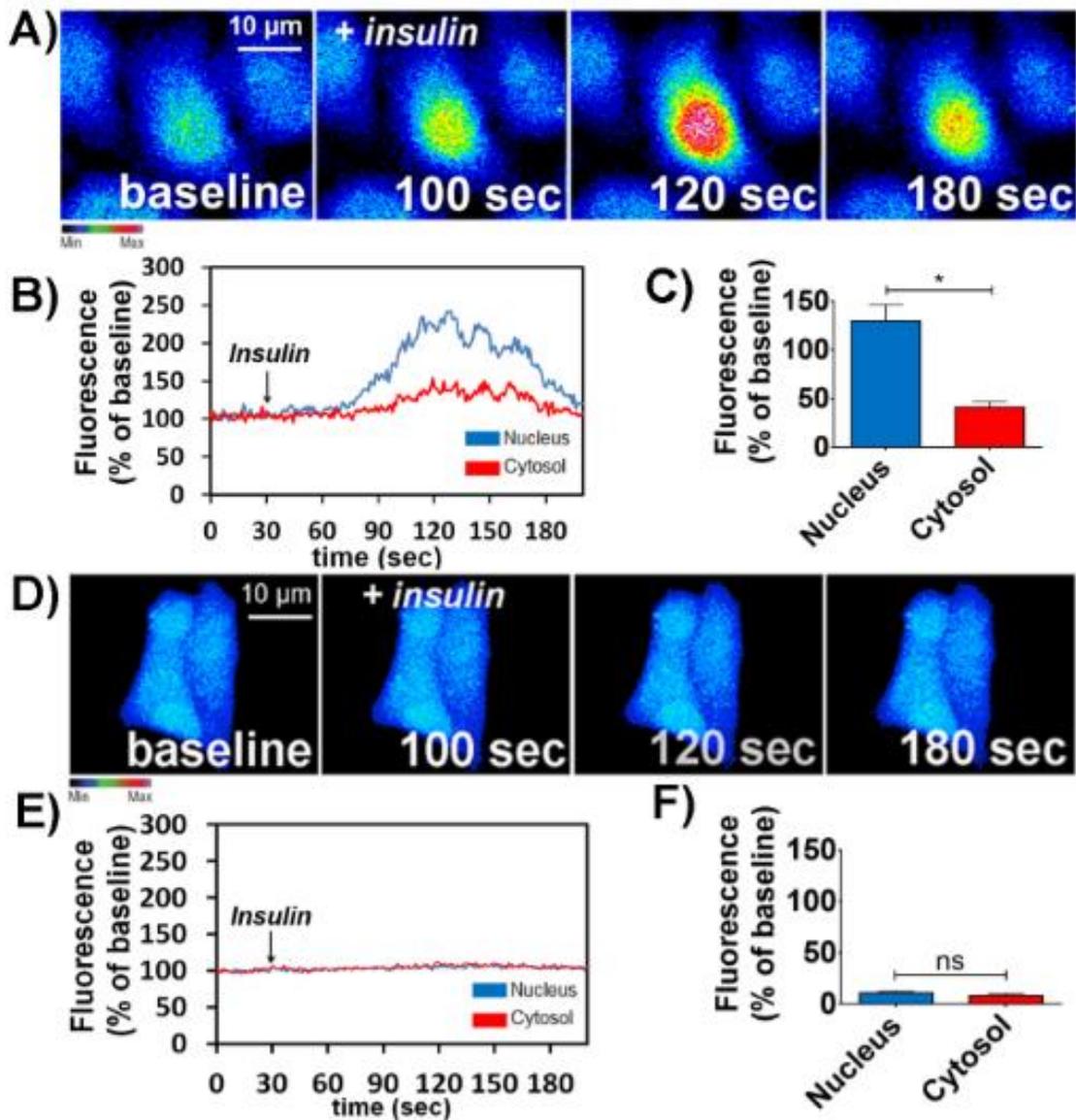


Figura 12: A desorganização dos *lipid-rafts* abole a sinalização de Ca^{+2} intracelular induzida por insulina em células HepG2. A-D) Imagens confocal de células HepG2 controle (A) e tratadas com MβCD (10mM), (D) carregadas com Fluo-4/AM (6 μM) e estimuladas com insulina (300nM). Imagens foram pseudocoloridas de acordo com a escala mostrada embaixo dos painéis A e D. B) Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) do grupo controle. C) Sumário dos estudos de Ca^{+2} no grupo HepG2 controle. E) Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) do grupo MβCD (10mM). F) Sumário dos estudos de Ca^{+2} no grupo HepG2 tratado com MβCD (10mM). Valores representam a média ± desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way* ANOVA ou *t-test student* (* $p < 0,05$, $n = 55$ células por grupo). Barra de escala = 10μM.

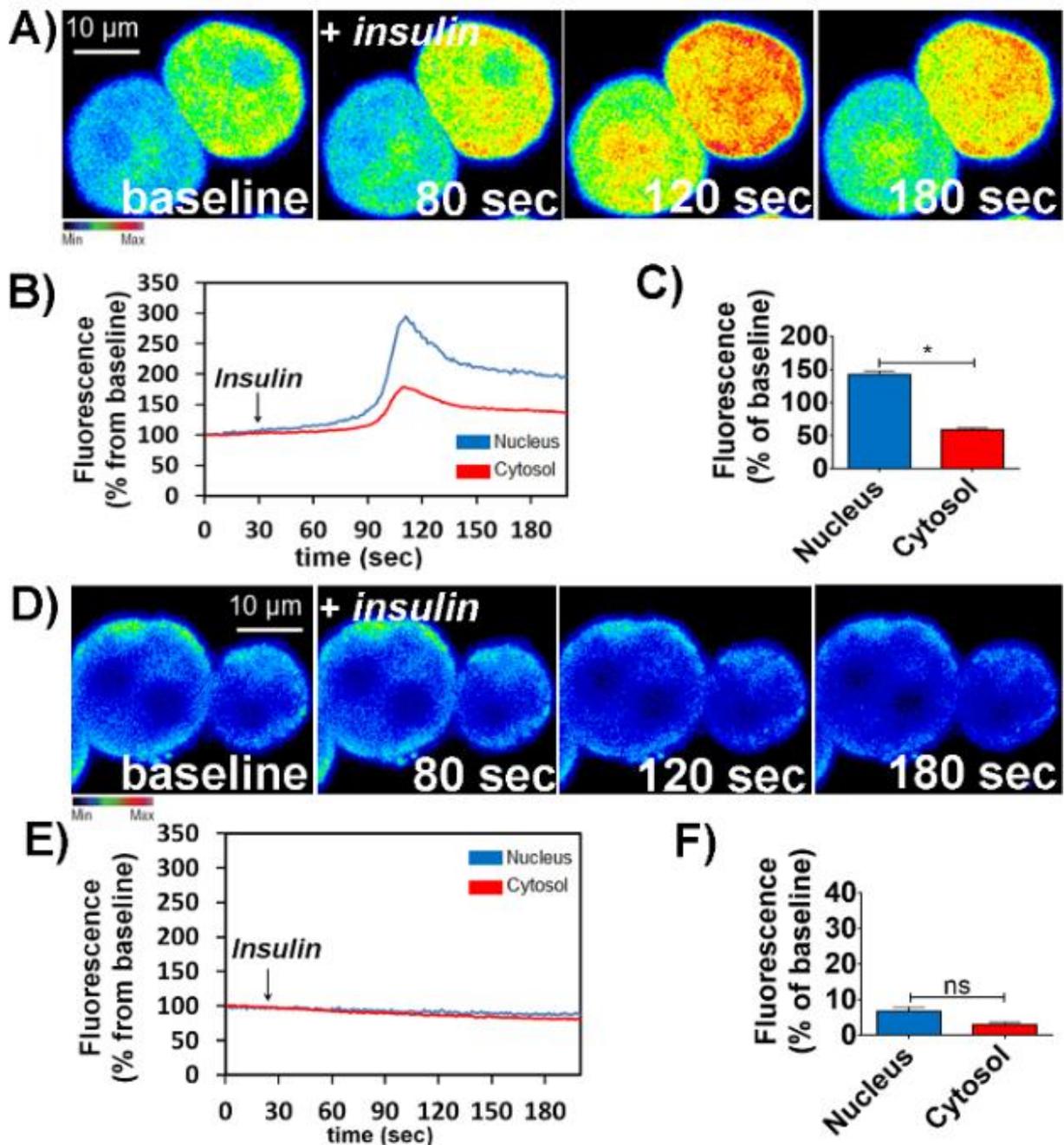


Figura 13: A desorganização dos *lipid-rafts* abole a sinalização de Ca^{2+} intracelular induzida por insulina em hepatócitos. A-D) Imagens confocal de hepatócitos controle (A) e tratados com M β CD (10mM) (D), carregados com Fluo-4/AM (6 μM) e estimulados com insulina (300nM). Imagens foram pseudocoloridas de acordo com a escala mostrada embaixo dos painéis A e D. B) Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) do grupo controle. C) Sumário dos estudos de Ca^{2+} no grupo hepatócito controle. E) Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) do grupo M β CD (10mM). F) Sumário dos estudos de Ca^{2+} no grupo hepatócito tratado com M β CD (10mM). Valores representam a média \pm desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way ANOVA* ou *t-test student* (* $p < 0,05$, $n = 57$ células por grupo). Barra de escala = 10 μM

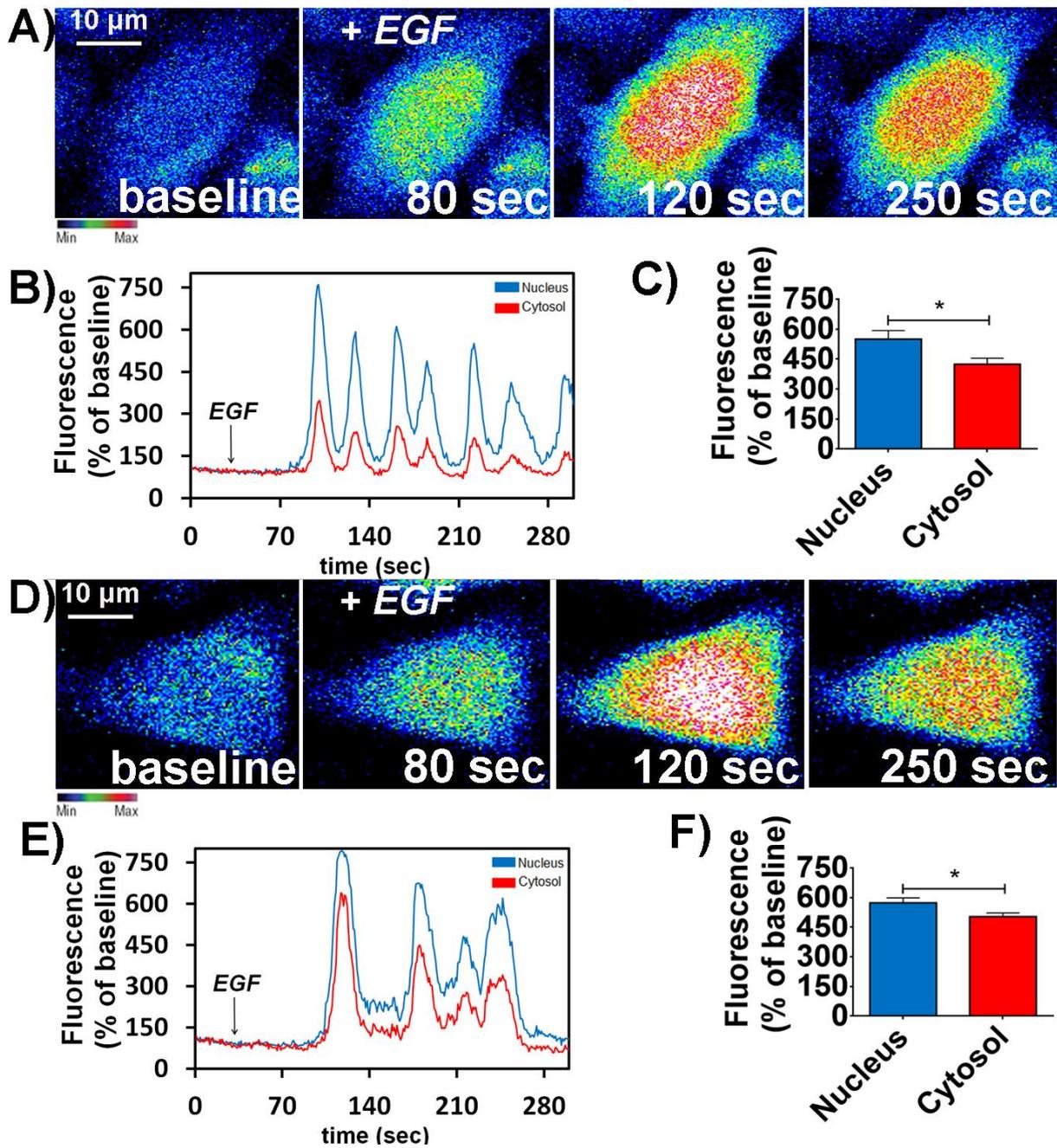


Figura 14: A sinalização de Ca^{+2} induzida por EGF ou HGF não é alterada devido a desorganização dos *lipid-rafts*. A-D) Imagens confocal de células HepG2 controle (A) e tratadas com M β CD (10mM) (D), carregadas com Fluo-4/AM (6 μM) e estimuladas com EGF (50ng/mL). Imagens foram pseudocoloridas de acordo com a escala mostrada embaixo dos painéis A e D. B) Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) do grupo controle. C) Sumário dos estudos de Ca^{+2} no grupo HepG2 controle. E) Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) do grupo M β CD (10mM). F) Sumário dos estudos de Ca^{+2} no grupo HepG2 tratado com M β CD (10mM).

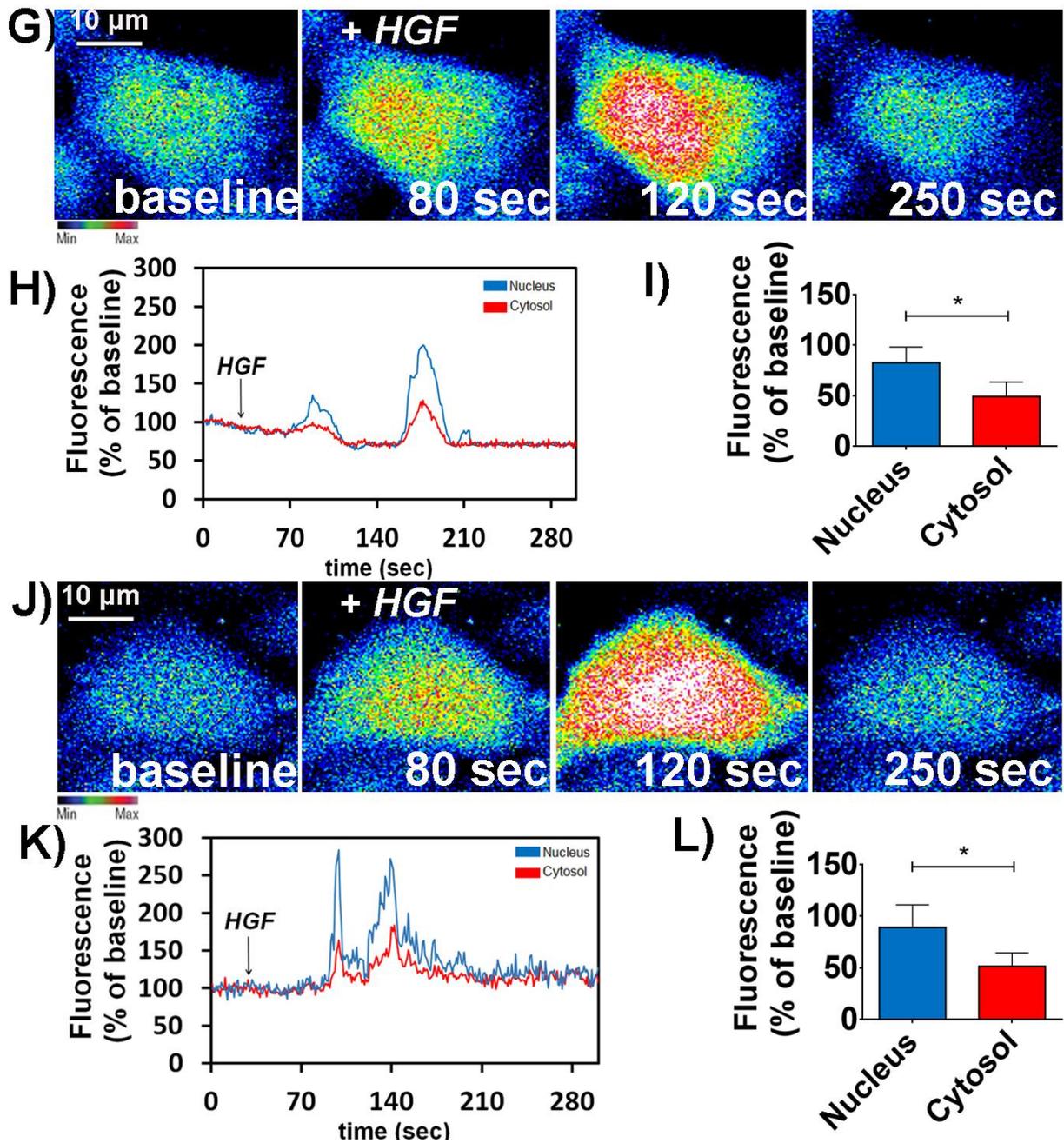


Figura 14 (continuação): G-J) Imagens confocal de células HepG2 controle (A) e tratadas com M β CD (10mM) (D), carregadas com Fluo-4/AM (6 μ M) e estimuladas com HGF (100ng/mL). Imagens foram pseudocoloridas de acordo com a escala mostrada embaixo dos painéis G e J. H) Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) do grupo controle. I) Sumário dos estudos de Ca⁺² no grupo HepG2 controle. K) Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) do grupo M β CD (10mM). J) Sumário dos estudos de Ca⁺² no grupo HepG2 tratado com M β CD (10mM). Valores representam a média \pm desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way ANOVA* ou *t-test student* (* p<0,05, n=45 células por grupo). Barra de escala = 10 μ M.

4.4 O metabolismo e a proliferação celular induzidos por insulina *in vitro* são debilitados devido à desorganização dos *rafts* de membrana

Uma vez ligada a seu receptor, a molécula de insulina induz diversas funções metabólicas, entre elas a proliferação e o metabolismo celular (Di Guglielmo, 1998; Amaya, 2014). As ações metabólicas da insulina no fígado são mediadas principalmente pela via da PI3K -Akt/PKB (revisado por Taniguchi, 2006). De fato, nossos resultados demonstram que tanto células HepG2 quanto hepatócitos, quando incubados com insulina (300nM), apresentaram um aumento da fosforilação de Akt (p-Akt) (FIGURA 15A-B), evento inibido quando as células tiveram os *rafts* de membrana desorganizados (FIGURA 15A-B, última coluna de cada gráfico), mostrando que a ativação de Akt pelo IR é dependente da organização das balsas de membrana (HepG2: Controle = $0,16 \pm 0,01$ a.u., Insulina 300nM = $1,09 \pm 0,13$ a.u., e M β CD + Insulina = $0,56 \pm 0,06$ a.u. / Hepatócitos: Controle = $0,80 \pm 0,19$ a.u., Insulina (300nM) = $2,6 \pm 0,40$ a.u., e M β CD + Insulina = $0,84 \pm 0,6$ a.u. $p < 0,05$, n=3 experimentos individuais). Já é sabido que a fosforilação da Akt é essencial para o metabolismo de glicose no tecido muscular e fígado (Whiteman, 2002; Ono, 2003). Sendo assim, avaliamos o metabolismo energético celular induzido pela insulina, em células submetidas à desestruturação dos *rafts*, realizando a dosagem de glicose do meio. Como esperado, ambas as células, quando tratadas com M β CD (10mM), mas não com o análogo inativo HYCD, apresentaram uma redução na captação de glicose (HepG2: Controle = 100%, Controle + Insulina (300nM) = $50,93 \pm 7,2\%$, M β CD + Insulina = $83,15 \pm 8,4\%$ e HYCD + Insulina = $52,15 \pm 5,4\%$ / Hepatócitos: Controle = 100%, Insulina (300nM) = $80,91 \pm 2,25\%$, M β CD + Insulina = $96,95 \pm 3,9\%$ e HYCD + Insulina = $81,22 \pm 3,2\%$ $p < 0,05$, n=3 experimentos individuais em triplicata) (FIGURA 15C-D), mostrando a real dependência da ativação da via da Akt para o metabolismo energético dependente de insulina.

Sabendo que a liberação do Ca⁺² de estoques nucleares induzida pela insulina é essencial para a proliferação celular (Rodrigues, 2007; Amaya, 2014) e que a desorganização dos *rafts* aboliu a sinalização de Ca⁺² induzida por este hormônio, decidimos investigar a taxa de proliferação celular induzida pela insulina em células tratadas que tiveram o colesterol de membrana reduzido. O ensaio de BrdU realizado em células HepG2 demonstrou que concentrações crescentes de insulina (300, 600 e 1200nM) induzem a proliferação celular, efeito inibido pela remoção do colesterol de

membrana (FIGURA 16A-B) (0% soro = 100%; 10% soro = $176 \pm 12\%$, M β CD + 10% soro = $110,0 \pm 11\%$, Insulina (300nM) = $135 \pm 8\%$, M β CD + Insulina (300nM) = $94,2 \pm 4,1\%$, Insulina (600nM) = $146 \pm 8\%$, M β CD + Insulina (600nM) = $85 \pm 6\%$, Insulina (1200nM) = $157 \pm 8\%$, M β CD + Insulina (1200nM) = $84 \pm 8\%$ $p < 0,05$, n=3 experimentos individuais em triplicata).

As ERK1/2 são membros da superfamília de mitógenos ativados por ligantes e desempenham funções de proliferação celular e apoptose (revisado por Mebratu, 2009). Uma vez fosforiladas, essas enzimas ativam diversos fatores de transcrição nucleares e proteínas citoplasmáticas envolvidas com a regulação da mitose (Howe, 1992; revisado por Blenis, 1993; Treisman, 1994). Por outro lado, hiperativação espaço-temporal dessas enzimas pode levar a uma parada do ciclo celular, impedindo a mitose devido a um acúmulo de ciclinas D1 e da proteína inibidora de cinase dependente de ciclina 1 (p21cip1) (Clark, 2004; revisado por Chambard e colaboradores, 2006). Assim como outros fatores de crescimento, a insulina também leva a fosforilação de ERK1/2 (Denton, 1995; Kayali, 2000). Quando células HepG2 e hepatócitos foram estimulados com insulina 300nM, de fato observamos um aumento da ativação de ERK1/2 (FIGURA 16C-D). Porém, quando previamente tratadas com M β CD (10mM), estas células apresentaram uma hiperativação destas enzimas (HepG2: Controle = $0,29 \pm 0,03$ a.u., Insulina (300nM) = $6,61 \pm 1,6$ a.u., M β CD = $32,6 \pm 1,5$ a.u e M β CD + Insulina = $30,7 \pm 0,5$ a.u. / Hepatócitos: Controle = $9,3 \pm 1,5$ a.u., Insulina (300nM) = $31,19 \pm 0,8$ a.u., M β CD = $64,31 \pm 8,5$ e M β CD + Insulina = $66,33 \pm 9,4$ a.u.; $p < 0,05$, n=3 experimentos individuais) (FIGURA 16C-D, última coluna de cada gráfico), o que vai ao encontro do bloqueio da proliferação celular observado nos ensaios de BrdU.

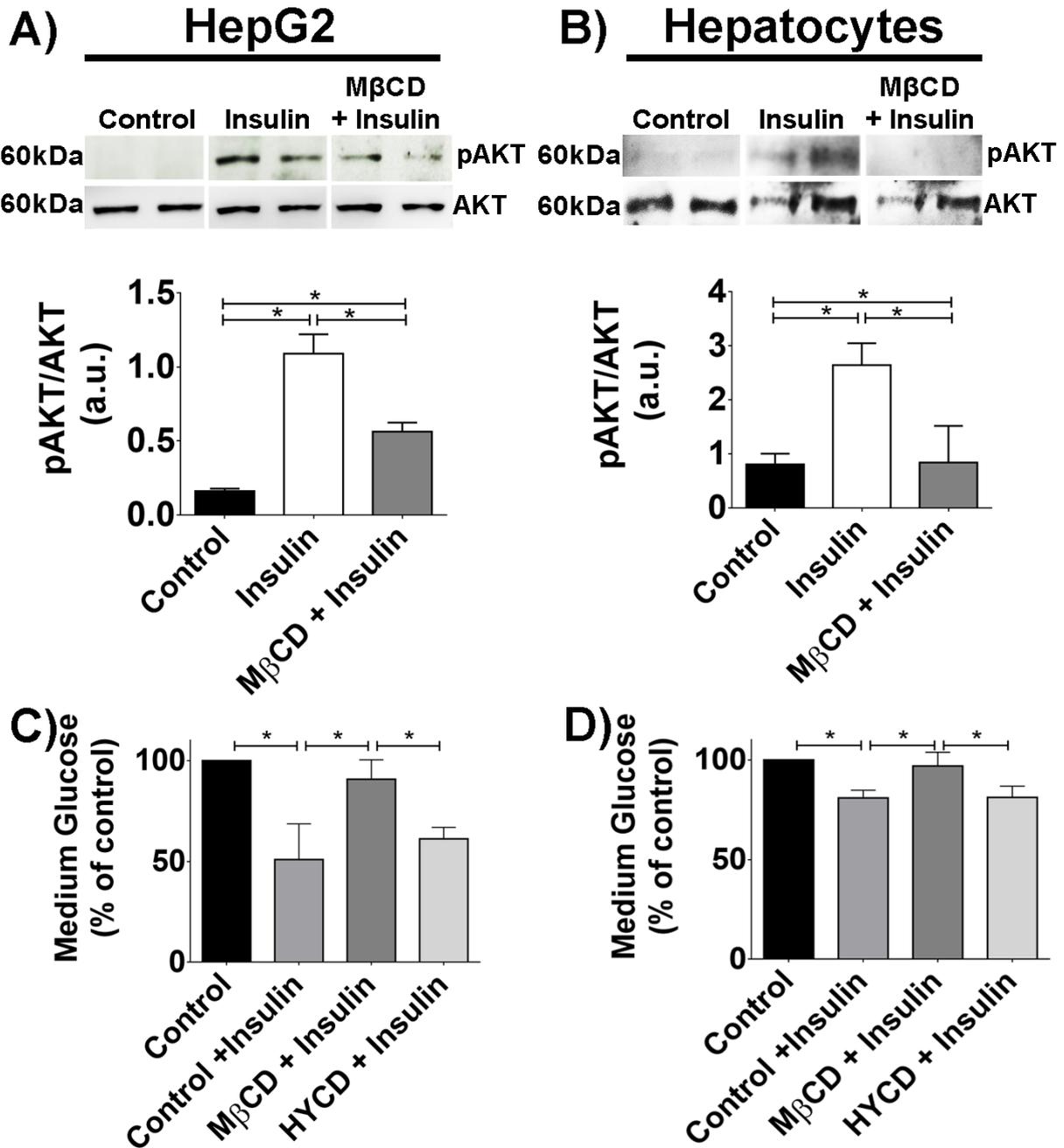


Figura 15: O metabolismo hepatocelular de carboidrato é alterado devido à remoção do colesterol membranar e consequente desorganização dos rafts de membrana. *Imunoblottings* representativos de lisado celular total de células HepG2 (A) (controle, estimuladas com Insulina (300nM) e tratadas com M β CD (10mM) e estimuladas com Insulina (300nM)) e hepatócitos primários (B) (controle, estimulados com Insulina (300nM) e tratados com M β CD (10mM) e estimulados com Insulina (300nM)). Gráficos abaixo representam, respectivamente, a quantificação densitométrica dos níveis totais de pAkt em cada condição. (* $p < 0,05$, $n = 3$ experimentos individuais). C-D) Quantificação dos níveis de glicose presentes no meio de cultura em cada grupo representado para células HepG2 (C) e hepatócitos primários (D). HYCD (10mM) foi utilizado como controle negativo. (* $p < 0,05$, $n = 3$ experimentos individuais em triplicata). Valores representam a média \pm desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way ANOVA* ou *t-test student*.

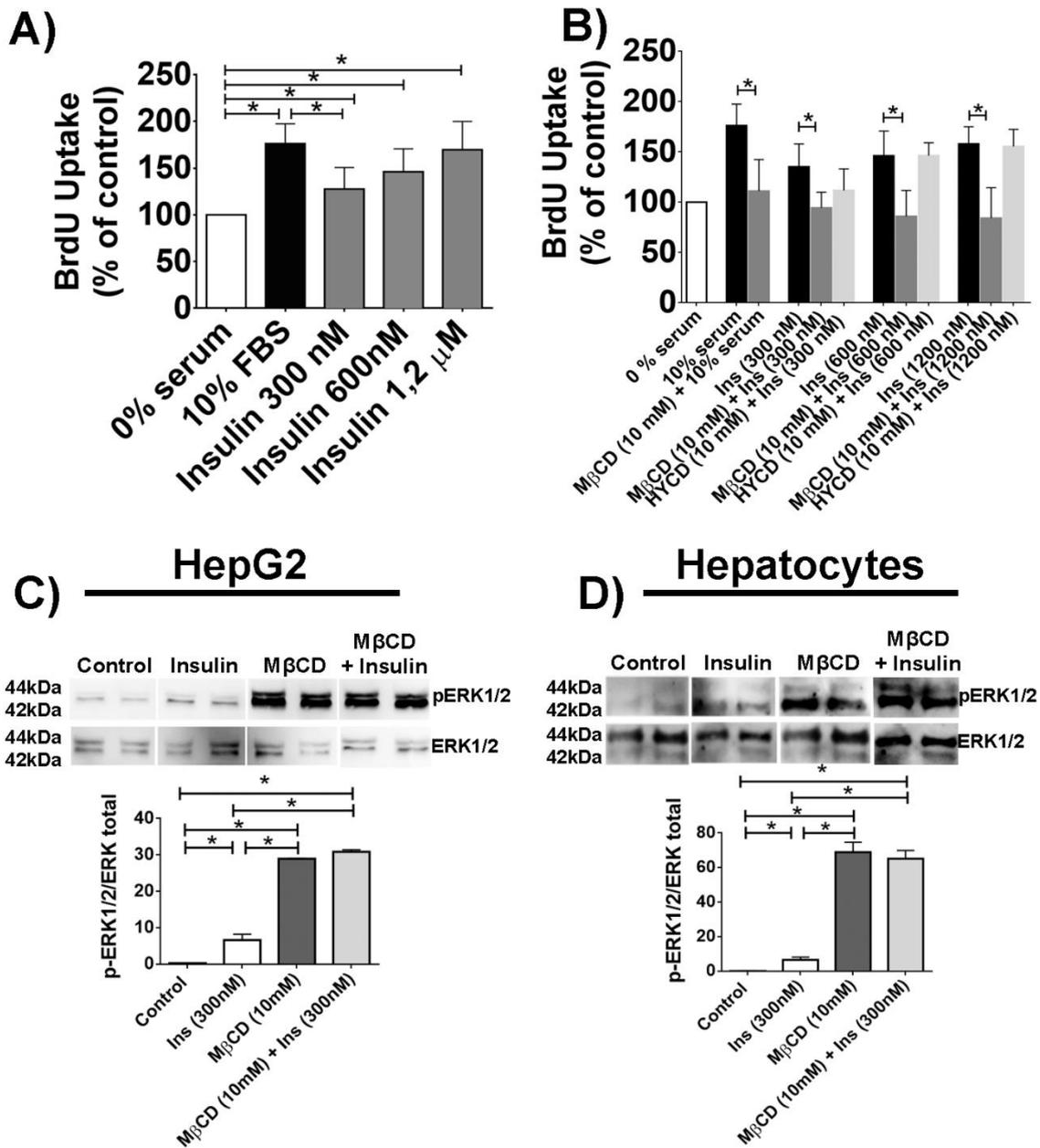


Figura 16: O efeito mitogênico da insulina é reduzido devido à remoção do colesterol de membrana. **A)** curva dose resposta da captação de BrdU em células HepG2 não estimuladas ou com as respectivas concentrações de insulina (300, 600, 1200nM). Soro fetal bovino a 10% foi utilizado como controle positivo do ensaio. (* $p < 0,05$, $n = 3$ experimentos). **B)** Curva dose resposta da captação de BrdU em células HepG2 controle (barras pretas), incubadas com MβCD (10mM) (barras chumbo) ou HYCD (10mM) (barras cinza) e posteriormente estimuladas com as concentrações assinaladas de insulina. Soro fetal bovino a 10% foi utilizado como controle positivo do ensaio (barra preta), (* $p < 0,05$, $n = 3$ experimentos individuais). **C-D)** *Imunoblottings* representativos de lisado celular total de células HepG2 (**C**) e hepatócitos (**D**) (controle, estimulados com insulina (300nM), tratados com MβCD (10mM) e tratados com MβCD (10mM) + insulina (300nM)). Gráficos abaixo representam, respectivamente, a quantificação densitométrica dos níveis totais de pERK1/2 em cada condição. (* $p < 0,05$, $n = 3$ experimentos individuais em triplicata). Valores representam a média \pm desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way ANOVA* ou *t-test student*.

4.5 A sinalização de Ca²⁺ induzida por insulina em hepatócitos e no fígado *in vivo* é reduzida em animais tratados com lovastatina

Visto que a desorganização dos *rafts* de membrana em células em cultura ocasionou redução significativa na proliferação celular, partimos para a investigação *in vivo* com o objetivo de verificar se a depleção do colesterol de membrana teria alguma participação na sinalização de insulina no fígado e no efeito proliferativo de hepatócitos após a hepatectomia parcial de 70%, o que resultaria em falha do processo de regeneração hepática. Para depletar o colesterol *in vivo*, utilizamos o tratamento intraperitoneal com lovastatina na dosagem de 15mg/kg por dia, por um período de 14 dias, dosagem essa eficiente em inibir a biossíntese do colesterol em diversos modelos e estudos já realizados (Low, 1992; Stowe, 1999; Björkhem-Bergman, 2010). A lovastatina, assim como outras drogas do grupo das estatinas, é uma droga inibidora competitiva da hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA-redutase), enzima responsável pela síntese do mevalonato, um precursor da molécula de colesterol (revisado por Tobert, 2003). No ano de 2012, estima-se que cerca de 220.000 novas pessoas iniciaram o tratamento com alguma droga do grupo das estatinas (IMS Health, 2012). Em nossos experimentos, a escolha do tratamento intraperitoneal, e não oral, deveu-se ao fato de que neste modelo de tratamento, a biodisponibilidade da droga é maior do que pela via enteral (Björkhem-Bergman, 2010). A linha do tempo representando os procedimentos realizados está demonstrada na FIGURA 17A. Como esperado, o tratamento com a lovastatina reduziu significativamente a concentração total do colesterol do fígado dos animais que receberam o tratamento em comparação com os que receberam apenas injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% (Controle: $2,6 \pm 0,14$ mg vs Lovastatina: $1,4 \pm 0,08$ mg; * $p < 0,05$, n=5 amostras de fígado por grupo) (FIGURA 17C). Além disso, a administração da estatina não alterou o peso dos animais ao longo do tratamento (FIGURA 17B).

Diversos estudos demonstram que as cavéolas são um subtipo de microdomínios de membrana enriquecidos com colesterol e que apresentam uma grande concentração da proteína Cav-1, (Murata, 1995). Além disso, sabe-se que Cav-1 hepática exerce um papel importante no metabolismo lipídico e na regeneração hepática (Pol, 2001; Fernandez, 2006; Woundenberg, 2010). Após 14 dias de tratamento, podemos observar que o padrão de marcação de Cav-1, uma proteína associada com microdomínios de membrana ricos

em colesterol, se torna mais homogêneo, quando comparado com o grupo controle (FIGURA 17D). Isso é um indicativo de que o tratamento com a lovastatina desorganiza de forma eficiente os *rafts* de membrana. Para verificar qual o efeito do tratamento na expressão de IR e de Cav-1, realizamos *western blotting* com o lisado total de porção do tecido hepático. Como esperado, a densidade total de IR permanece a mesma, quando comparada com o grupo controle (Controle = $1,57 \pm 0,01$ a.u. vs Lovastatina = $1,58 \pm 0,01$; $p=ns$, $n= 5$ amostras de fígado por grupo), porém, os animais tratados com lovastatina apresentaram uma maior expressão de Cav-1 (Controle = $5,25 \pm 0,7$ a.u. vs Lovastatina = $10,58 \pm 0,30$; $*p < 0,05$, $n= 5$ amostras de fígado por grupo) (FIGURA 17E-F).

De posse destes dados, investigamos se a alteração observada na organização dos *rafts/cavéolas* poderia interferir na sinalização de Ca^{+2} estimulada por insulina nos hepatócitos de animais controle ou tratados com lovastatina. A FIGURA 18A-B apresenta traçados representativos do sinal fluorescente do transiente de Ca^{+2} dos hepatócitos extraídos de animais controles ou tratados, onde podemos observar que a resposta à insulina é reduzida nas células do grupo tratado. Porém, quando as mesmas células foram estimuladas com vasopressina (AVP $1\mu M$), tanto o grupo controle quanto o grupo tratado apresentaram amplitude típica do sinal de Ca^{+2} . Além disso, o número total de células que responderam à insulina/número total de células responsivas a AVP é consideravelmente menor no grupo que recebeu o tratamento com a estatina (Controle = $1,1 \pm 0,3$ células vs Lovastatina = $0,44 \pm 0,2$ células; $*p < 0,05$, $n=5$ experimentos individuais por grupo), (FIGURA 18C). Como observamos uma falha na sinalização de cálcio induzida pela insulina nos hepatócitos dos animais tratados *in vitro*, decidimos investigar como estaria a sinalização de Ca^{+2} induzida pela insulina em fígados *in vivo* de animais controle e tratados com lovastatina. Este experimento inédito na literatura demonstrou que animais tratados com lovastatina apresentam uma menor amplitude do sinal de Ca^{+2} quando recebiam administração intravenosa de insulina (Controle= $143 \pm 3\%$ vs Lovastatina= $111 \pm 1\%$, $*p < 0,05$, $n=5$ animais por grupo). Além disso, o número de células que responderam à insulina era grandemente reduzido nos animais que receberam o tratamento com a estatina (Controle= $98 \pm 1\%$ vs lovastatina= $20 \pm 4\%$, $*p < 0,05$ e $n= 5$ animais e 5 campos analisados por grupo). Desta forma, demonstramos tanto *in vitro* quanto *in vivo* que hepatócitos de animais tratados com lovastatina apresentam menor resposta à insulina, o que gera menor amplitude do sinal de Ca^{+2} e menor número de células responsivas a este hormônio (FIGURA 18).

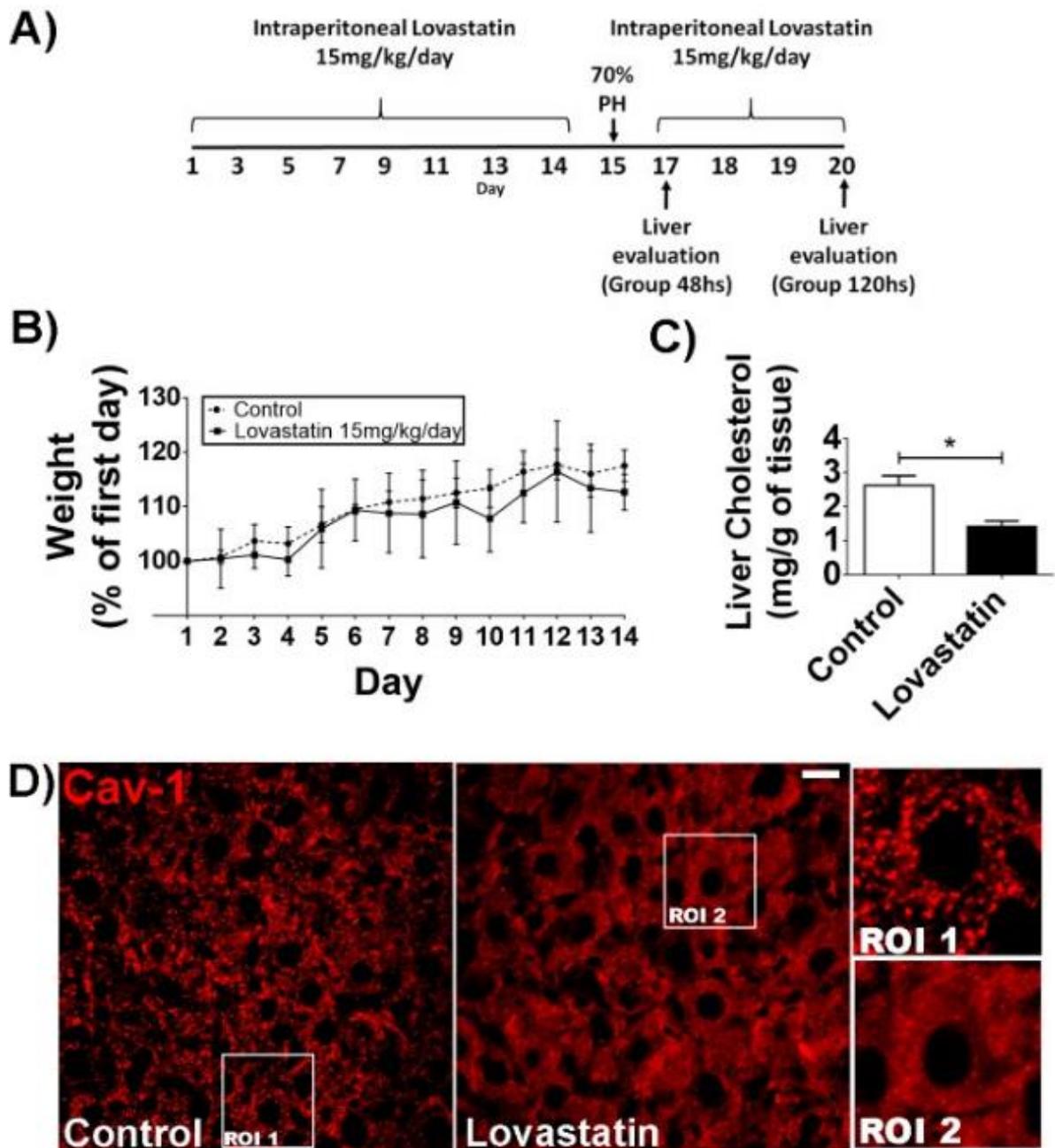


Figura 17: O tratamento com lovastatina altera a organização celular de caveolina-1 e reduz o colesterol total do fígado de ratos. **A)** Desenho experimental dos procedimentos *in vivo* realizados com ratos. **B)** Gráfico representativo do peso dos animais tratados diariamente com injeção intraperitoneal de solução salina (controle, linha simples) ou lovastatina 15mg/kg (linha descontinua) durante 14 dias (n=10 animais). **C)** Concentração de colesterol total do fígado de animais controle ou tratados com lovastatina após 14 dias de tratamento (* $p < 0,05$, n= 5 amostras por grupo). **D)** Cortes de fígado de animais controle (painel da esquerda) e tratados com lovastatina (painel da direita) marcados por imunofluorescência para Caveolina-1 (Cav-1). A extrema direita, encontra-se magnificação de uma região de interesse delimitada nas imagens. n=5 fatias e 5 campos analisados por fatia por grupo.

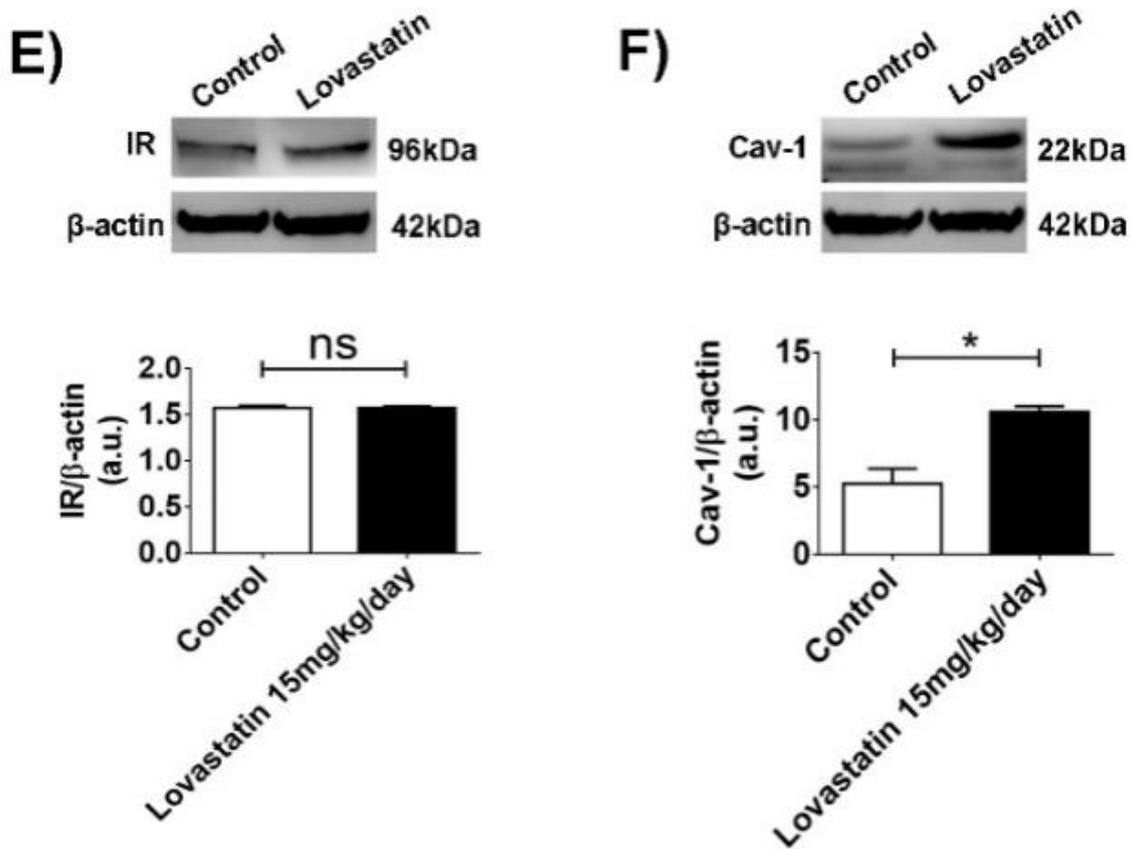


Figura 17 (continuação): E-F *Imunoblottings* representativos de lisado de tecido hepático total de ratos controle ou tratados com lovastatina para verificação da expressão do receptor para insulina (**E**) ou Caveolina-1 (**F**), (* $P < 0,05$, $n = 5$ animais). Valores representam a média \pm desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way* ANOVA ou *t-test student*. Barra de escala= 20 μ M.

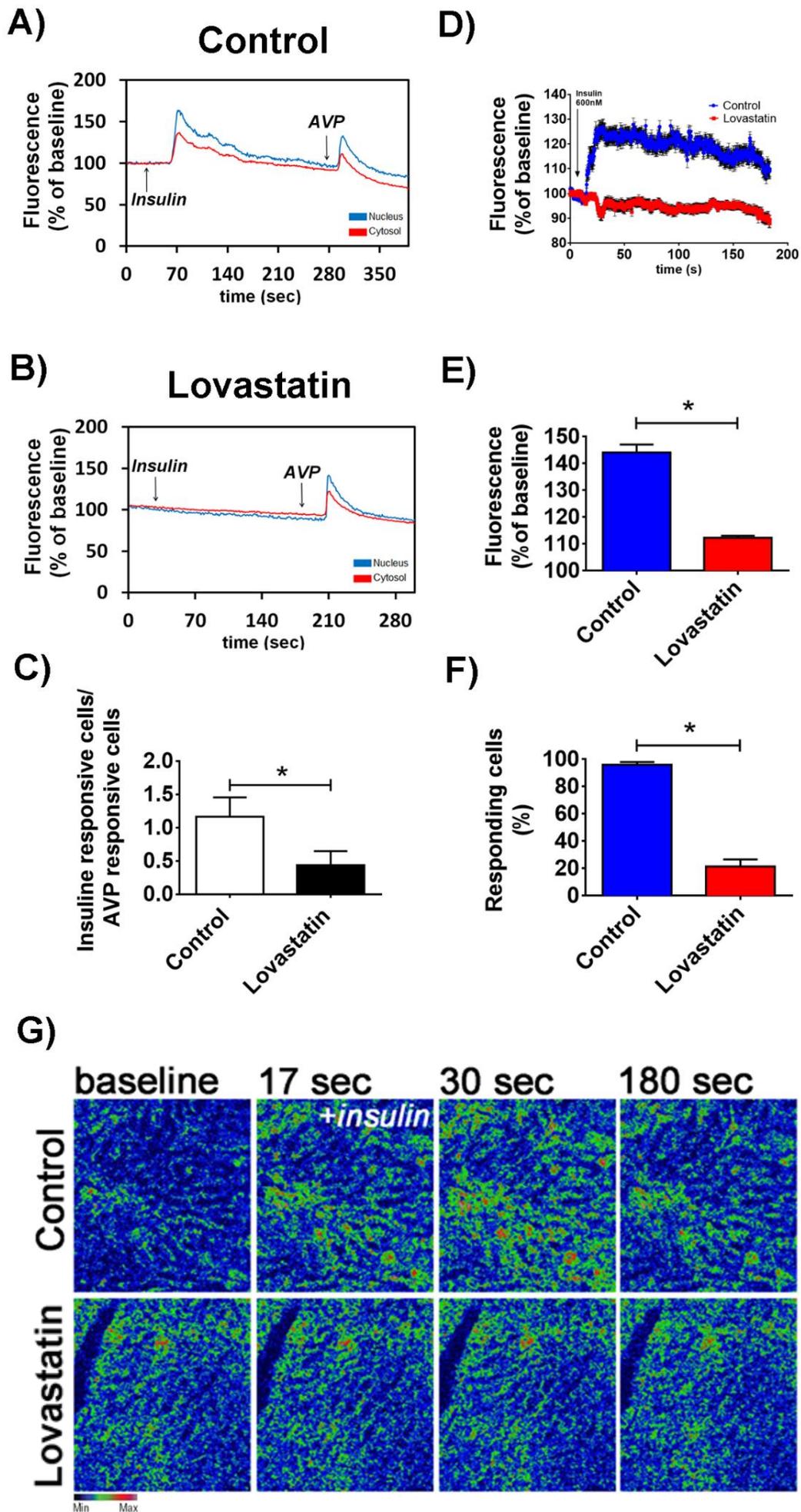


Figura 18: A sinalização de Ca^{+2} induzida por insulina em hepatócitos primários e no fígado *in vivo* é debilitada em animais tratados com lovastatina **A)** Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) de hepatócitos do grupo controle quando estimulados com insulina (300nM) ou AVP (100nM). **B)** Representação gráfica do aumento da fluorescência no núcleo (linha azul) e no citosol (linha vermelha) de hepatócitos do grupo lovastatina quando estimulados com insulina (300nM) ou AVP (100nM). **C)** Quantificação da razão entre o número de hepatócitos responsivos à insulina/ número de células responsivos a AVP em ambos os grupos (Controle e Lovastatina) (* $p < 0,05$, $n = 47$ células analisadas por grupo). **D)** Representação gráfica do aumento da fluorescência *in vivo* nos hepatócitos do fígado de animais controle (linha azul) ou tratados com lovastatina (linha vermelha) e estimulados com insulina (600nM) ($n = 4$ animais por grupo) **E)** Sumário dos estudos de transiente de Ca^{+2} *in vivo* no fígado de ratos (* $p < 0,05$; $n = 55$ células analisadas por grupo). **F)** Análise gráfica do número (%) de células responsivas a insulina no fígado de animais controle ou tratados com lovastatina. Observar redução do número de hepatócitos responsivos a insulina no grupo de animais tratados com lovastatina (* $p < 0,05$; $n = 4$ animais e 4 imagens analisadas por grupo experimental). **G)** Imagens de microscopia confocal de fígados carregados com Fluo-4/AM (6 μM), estimulados com insulina (600nM) e visualizados durante 5 minutos *in vivo*. Imagens foram pseudocoloridas de acordo com barra de escala indicada no painel G.

4.6 A regeneração hepática é atrasada em animais tratados com lovastatina

Para investigar a relevância fisiológica do colesterol de membrana na capacidade proliferativa dos hepatócitos e na consequente regeneração hepática *in vivo*, submetemos os ratos controle ou tratados com lovastatina à hepatectomia parcial de 70% (PH 70%). Depois da cirurgia, um grupo de animais foi avaliado para a regeneração hepática após 48 horas e outro grupo, após 120 horas. Um grupo foi apenas submetido ao estresse cirúrgico, sem o procedimento de retirada do fígado (grupo Sham). Os tempos foram escolhidos de acordo com a taxa de proliferação dos hepatócitos após a hepatectomia, tendo seu ápice após 48 horas e atingindo um platô reducional após 120 horas (revisado por Michalopoulos, 2010). Como pode ser observado na FIGURA 19A, os animais tratados com lovastatina apresentaram uma menor regeneração do fígado, quando comparado ao grupo controle, após 48 horas da hepatectomia (Sham=3,82±0,15%, PH Controle= 2,6±0,14% e PH Lovastatina= 1,6±0,09%; *p<0,05, n=5 animais por grupo). No entanto, após 120 horas, todos os animais apresentaram a mesma taxa de regeneração (Sham=3,82±0,16%, PH Controle= 3,6±0,01% e PH Lovastatina= 3,6±0,08%; p=ns, n=5 animais por grupo) (FIGURA 19B). Assim, o tratamento com lovastatina não impede a regeneração hepática, mas a retarda, possivelmente pelo fato de outros potentes mitógenos hepáticos, como o EGF e HGF não requererem a organização das balsas de membrana para desencadear o sinal de Ca⁺² intranuclear, já demonstrado ser essencial para a proliferação dos hepatócitos e para a regeneração hepática consequente (Amaya, 2014). Em um trabalho realizado por Björkhem-Bergman, 2010, os autores demonstraram que o número de lesões neoplásicas induzidas por Dietilnitrosamina (DEN) após hepatectomia parcial, é menor em animais que receberam o tratamento com lovastatina. Sendo assim, os efeitos deletérios da lovastatina sob a proliferação celular parece afetar tanto células saudáveis quanto neoplásicas.

Para confirmar o efeito da lovastatina sobre a proliferação celular *in vivo*, realizamos a marcação para PCNA em cortes do fígado dos animais após a regeneração. Como esperado, o número de células PCNA positivas (células em proliferação) é significativamente maior nos animais controle, após 48 horas de regeneração (Sham= 9,3±2,5%, PH controle= 35±7% PH Lovastatina= 20±5%,; *p<0,05, n= 5 fatias de 5 animais por grupo) (FIGURA 19C, painel superior, quantificação em 19D). Porém, após 120 horas de regeneração, o número de células PCNA positivas era maior no grupo

tratado com lovastatina, em comparação com o grupo controle (Sham= $9,3 \pm 2,5\%$, PH controle= $13,2 \pm 1,6\%$ PH Lovastatina= $27,4 \pm 3,2\%$,; * $p < 0,05$, n= 5 fatias de 5 animais por grupo) (FIGURA 19C, painel inferior, quantificação em 19E). Sendo assim, demonstramos de forma inédita que o tratamento com a estatina, apesar de não impedir a regeneração hepática, resultou em um atraso da proliferação celular, como comprovado pela marcação do PCNA.

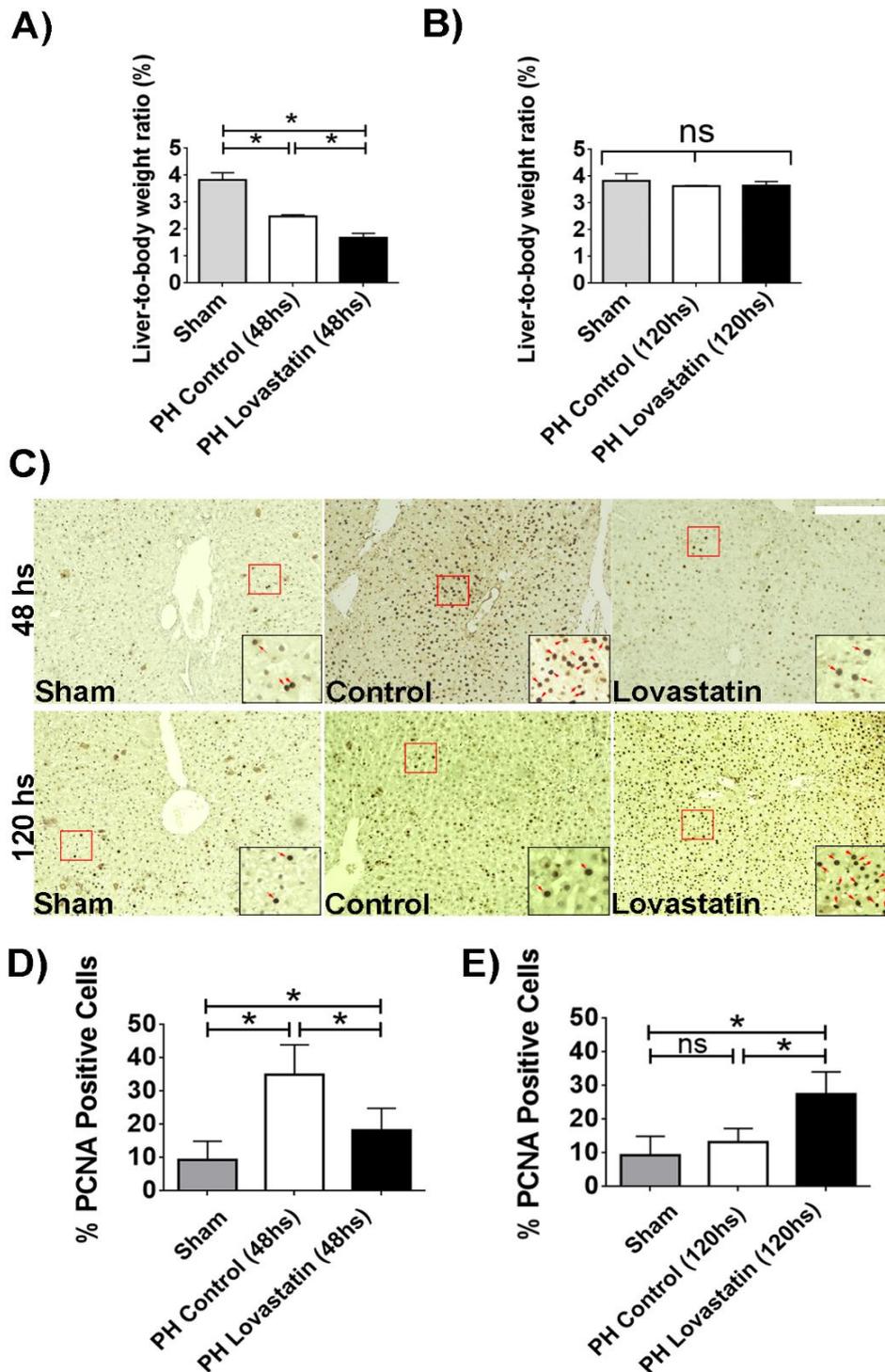


Figura 19: A regeneração hepática sofre atraso em animais tratados com lovastatina. A-B)

Gráfico da razão entre o peso do fígado/peso total do animal controle ou tratado, após 48 horas (A) e 120 horas (B) de hepatectomia parcial (PH 70%), (* $p < 0,05$, $n = 3$ animais por grupo). **C)** Imagens representativas de imunohistoquímica para PCNA. Painéis superiores retratam imagens de corte de fígado dos animais sacrificados após 48 horas da hepatectomia parcial e painéis inferiores, 120 horas após o procedimento. **D-E)** Quantificação do número de células PCNA positivas/número total de núcleos por corte após 48 horas (E) ou 120 horas (F) da hepatectomia parcial. (* $p < 0,05$, $n = 5$ animais/ grupo e 10 cortes aleatoriamente selecionados/animal).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os *lipid-rafts*, microdomínios móveis especializados de membranas celulares enriquecidos em lipídios saturados e colesterol, são componentes-chave da arquitetura celular, na partição de proteínas na membrana e em eventos de sinalização intracelular. Os *rafts* já foram identificados nas membranas de todas as células hepáticas, parenquimatosas e não parenquimatosas (revisado por Dolganiuc, 2011). Apesar das controvérsias acerca de sua existência desde sua descoberta, evidências mostram cada vez mais que estas estruturas apresentam papel proeminente na sinalização celular, inclusive na sinalização de insulina, por funcionarem como plataformas de concentração para receptores de membrana. Neste trabalho, demonstramos que em células hepáticas, a sinalização mediada pelo IR é altamente dependente da organização dos *rafts*. Além disto, demonstramos também que a sinalização de Ca^{+2} ativada pela insulina é prejudicada em animais que receberam o tratamento com lovastatina, uma droga que foi capaz de desorganizar os *rafts* através da redução do colesterol da membrana celular. Para reforçar estes dados, demonstramos *in vivo* que a sinalização de Ca^{+2} no fígado *in vivo* é debilitada em animais tratados com lovastatina.

Desde sua descoberta e seu isolamento, a insulina é descrita como um hormônio anabólico com uma ampla gama de efeitos sobre o metabolismo celular, induzindo a captação de glicose da corrente sanguínea, estimulando a síntese e inibindo a degradação de glicogênio, de proteínas e lipídios (revisado por Straus, 1981). Além dos efeitos bem conhecidos sobre o metabolismo, a insulina também tem importante papel na estimulação da proliferação celular. A primeira descrição dos efeitos mitogênicos induzidos pela insulina data de 1924, por Gey e Thalimer (Gey e Thalimer, 1924), através da observação dos efeitos da adição de insulina em cultura de fibroblastos de galinha. Desde então, diversas outras evidências ao longo dos anos apontam a insulina como um potente mitógeno para células 3T3 (Holley e Kiernan, 1974), hepatócitos de ratos e linhagens de hepatomas (Leffert, 1977; Amaya, 2014), linhagens de células renais (Taub, 1979), células de melanoma (Mather e Sato, 1979) entre outras (revisado por Straus, 1981). No fígado, a insulina apresenta fortes efeitos metabólicos (Sanger, 1949; Michael, 2000; revisado por Agius, 2008) e mitogênicos (Michalopoulos e Pitot, 1975; Amaya, 2014; revisado por Michalopoulos e DeFrances, 1997), tendo funções significantes durante o processo de regeneração hepática através da ativação de seu receptor da família RTK, localizado na membrana plasmática. Além de promover a proliferação, a insulina também

é fundamental para a manutenção da diferenciação de linhagens celulares hepáticas *in vitro* (Leffert, 1977). Porém, a implicação da localização do IR nos *lipid-rafts* para a adequada função deste receptor ao mediar todos os efeitos acima descritos, ainda é papel de discussão por parte da comunidade científica.

Neste estudo, demonstramos que o IR apresenta grande colocalização com os *rafts* de membrana, em células hepáticas. Sendo assim, seria razoável pensar, que uma vez desorganizando as balsas lipídicas, a sinalização de insulina seria debilitada. De fato, a desorganização dos *rafts* resultou em *deficit* da sinalização de insulina, tanto no quesito metabólico quanto no proliferativo, e uma redução significativa no sinal de Ca^{+2} induzida por este hormônio. Em hepatócitos, células altamente polarizadas em região apical, canalicular, e em regiões basolaterais, as balsas lipídicas são responsáveis pelo acúmulo pericanalicular de $InsP_3R$, desta forma, estabelecendo, desta forma, uma direcionalidade nas ondas de Ca^{+2} (Nagata, 2007). Quanto realizamos a depleção do colesterol de membrana tanto em hepatócitos quanto em células HepG2, observamos uma grande redução do sinal de Ca^{+2} induzida por insulina. Porém, ao estimularmos as células, submetidas à desorganização dos *rafts* pelo tratamento com M β CD, com HGF ou EGF, nenhuma alteração significativa na sinalização de Ca^{+2} foi observada, mesmo EGFR estando colocalizado com os *rafts* de membrana.

O HGFR, também denominado *c-Met*, é ativado por HGF e desencadeia a proliferação, morfogênese e sobrevivência dos hepatócitos. Defeitos na sinalização mediada por HGF são uma das causas de carcinoma hepatocelular (Kanda, 1993). O HGFR é um heterodímero que exhibe atividade de tirosina quinase e associa-se a um complexo multiproteico para desencadear sua sinalização *downstream*, incluindo Src, PI3K, *GRB2 Associated Binding Protein 1* (Gab1) e cinase de adesão focal. A função adequada destes adaptadores/transdutores de sinal é largamente dependente da integridade dos *rafts* (Baillat, 2008; Biedi, 2003). Nosso estudo mostrou que, em células HepG2, o HGF inativo não está associado às balsas lipídicas e que a desorganização destas não resultou em falha na sinalização de Ca^{+2} induzida por esse fator de crescimento. Porém, não podemos afirmar que os efeitos *downstream* ao sinal de Ca^{+2} induzido pelo HGF não foram perturbados, uma vez que, mediante estímulo, HGFR se associa com proteínas localizadas nos *rafts* para mediar suas funções descritas anteriormente (Singleton, 2007).

Com relação ao EGF, sabe-se que este fator se liga ao EGFR e regula o crescimento de hepatócitos tanto *in vivo* como *in vitro* (Ruff-Jamison, 1994). A sinalização de EGFR ativa um grupo de transdutores de sinais e ativadores de transcrição, que aumentam a transcrição de um conjunto característico de genes de resposta precoce ao crescimento, levando à replicação hepática do DNA (Ruff-Jamison, 1994). Demonstramos que, assim como o IR, EGFR também está localizado nos microdomínios de membrana enriquecidos em colesterol. Contudo, diferentemente do que ocorreu com a sinalização de insulina em células que tiveram o colesterol de membrana reduzido, o sinal de Ca^{+2} induzido por EGF não foi alterado nesta situação. Já foi demonstrado que o tratamento com M β CD conduz a um aumento da atividade intrínseca da tirosina cinase do receptor de EGF. Além disso, apesar de localizados em balsas lipídicas enriquecidas com colesterol, EGFR é liberado deste compartimento para regiões adjacentes da membrana após tratamento com a ciclodextrina, tendo sua internalização, após ativação, também inibida (Pike e Casey, 2002). Isto explicaria porque a atividade e abundância do receptor na membrana são mantidas, não levando a alteração no sinal de Ca^{+2} induzido por EGF.

Com relação ao efeito da depleção do colesterol sobre a sinalização insulinérgica, um estudo anterior realizado com adipócitos 3T3-L1, demonstrou que a incubação destas células durante 50 minutos com M β CD foi suficiente para inibir a fosforilação de Akt e captação de glicose insulina-dependente, sem alterar a afinidade de ligação da insulina a seu receptor ou a abundância total de IR na membrana plasmática (Gustavsson, 1996). Em outro estudo do mesmo grupo e com o mesmo modelo celular (3T3-L1), foi demonstrado que a desorganização dos *rafts* também afeta os efeitos metabólicos da insulina, diminuindo a captação de glicose e fosforilação de Akt, mas nenhum efeito na ativação da via das MAPKs, através da ativação de ERK1/2, foi observado (Parpal, 2001). Indo de encontro a esses dados, demonstramos que o tratamento com M β CD interfere com os efeitos metabólicos da insulina em células hepáticas, porém demonstramos que este tratamento também levou à hiperfosforilação de ERK 1/2, o que, inesperadamente, ocasionou menor proliferação celular induzida por insulina. Desde sua descoberta em 1991 (Boulton, 1991), a fosforilação de ERK 1/2 e sua translocação nuclear, induzida por insulina ou por outros fatores de crescimento, é dita como essencial para a proliferação celular, desde que esta ativação seja espaço-temporalmente controlada. Já foi demonstrado que a ativação de ERK aumenta a expressão da ciclina D1 (Sewing, 1997; Woods, 1997), proteína nuclear envolvida com a progressão no ciclo celular que se

acumula no núcleo temporalmente e é, posteriormente, dirigida ao citoplasma para degradação via proteassoma. Além disso, a fosforilação de ERK também aumenta a expressão de p21Cip1, um fator proteico de duração curta que impede exportação de proteínas do núcleo para o citoplasma (Touitou, 2001). Sendo assim, a hiperativação de ERK leva a um acúmulo maciço no núcleo celular, de ambas as proteínas mencionadas, formando o complexo ciclina D1/p21Cd1, o que impede a exportação destas ciclinas para o citoplasma e faz com que as células fiquem “presa” em determinado estágio do ciclo celular, impedindo a progressão da mitose (Alt, 2002). Além disso, sabe-se, que a depleção do colesterol causa a hiperfosforilação de ERK em células Rat-1 de forma intrínseca (Furuchi e Anderson, 1998) e também mediada pelo aumento da autofosforilação do EGFR (Pike e Casey, 2002). Isto poderia explicar a menor proliferação de células HepG2 observada em nosso modelo, em que o tratamento com a ciclodextrina M β CD gerou hiperfosforilação de ERK 1/2 e menor proliferação celular.

Estima-se que a 220.000 pessoas por ano se prescrevem com drogas do grupo das estatinas para controle dos níveis séricos de colesterol (IMS Health, 2012). As estatinas são inibidores da HMG-CoA redutase, a enzima que catalisa o passo limitante da via biossintética do colesterol. Como classe de fármacos, as estatinas estão entre as drogas mais frequentemente prescritas em todo o mundo. A lovastatina foi a primeira estatina introduzida no mercado (1987) (Tobert, 2003). Desde então, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, rosuvastatina e pitavastatina foram utilizadas clinicamente (revisado por Tobert, 2003). A lovastatina, assim como as outras estatinas mencionadas, é um potente inibidor da HMG-CoA redutase, o que gera grande diminuição na biossíntese do colesterol (revisado por Tobert, 2003). De fato, observamos que animais tratados com lovastatina, apesar de não apresentarem redução no peso total ao longo do tratamento, tiveram grande redução nos níveis de colesterol total no fígado. Além disso, o nível da expressão de Cav-1, proteína localizada em microdomínios ricos em colesterol, foi aumentado e a distribuição desta proteína no fígado também foi alterada quando comparada com animais controle. O papel essencial de Cav-1 na regulação da função hepática é evidente, uma vez que camundongos *Cav-1* $-/-$ apresentam baixa taxa de regeneração hepática e de sobrevivência após hepatectomia parcial (Fernandez, 2006). Além disso, um aumento proeminente de Cav-1 hepática foi encontrado em casos de cirrose e esteatose hepática (Shah, 1999; Wang, 2005), o que reforça o papel de Cav-1 na regulação do colesterol intracelular (Smart, 1996) e da homeostase lipídica (Pal, 2001),

explicando assim o aumento encontrado em nosso modelo de desbalanço na biossíntese de colesterol.

Ao avaliarmos *in vivo* o sinal de Ca^{+2} induzido por insulina no fígado de animais tratados com lovastatina, observamos que a resposta dos hepatócitos foi significativamente menor que a do grupo controle. Estudos feitos em animais que receberam dieta rica em gorduras e açúcares por 4 semanas e que receberam tratamento com lovastatina, apresentaram marcada melhora na sensibilidade à insulina, caracterizada por um aumento na captação de glicose durante o teste de tolerância à insulina. Este aumento na sensibilidade à insulina esteve associado a um aumento da fosforilação da tirosina do IR induzida pela insulina (Lalli, 2008). Já em outro trabalho, foi demonstrado que o tratamento com estatinas foi capaz de induzir a resistência à insulina devido a inibição da cascata de sinalização do IR (Kain, 2015), o que vai ao encontro de diversos outros achados na literatura sobre o possível papel das estatinas na geração da diabetes devido à resistência à insulina (Sattar, 2010; Carter, 2013; Navarese, 2013; revisado por Brault, 2014). Contudo, nosso estudo focou na interferência gerada pelo tratamento com estatinas na regeneração hepática. Diversos fatores são cruciais para o processo de regeneração hepática, entre eles a insulina, que, no fígado, regula tanto o crescimento dos hepatócitos quanto seu metabolismo (Koonts e Iwahashi, 1981; Saltiel e Kahn, 2001; Amaya, 2014). Em estudo recente de Tseng e colaboradores, 2011, foi demonstrado que a insulina desempenha um papel crucial durante a regeneração do fígado.

A regeneração hepática após hepatectomia parcial constitui um processo biológico multifacetado que pode ser dividido em várias fases (Xu, 2010). Nas primeiras 2 horas após a lesão, os hepatócitos são ativados para reentrar no ciclo celular. Como consequência, ocorre uma intensa proliferação de hepatócitos, levando à restauração do parênquima hepático logo após 48 horas do procedimento. Com isso, o processo de regeneração é terminado com a substituição da massa hepática, ocorrendo principalmente devido à proliferação de hepatócitos pré-existentes em vez da ativação de células progenitoras (Nicou, 2007; Duncan, 2009). Todo esse processo é orquestrado por fatores de crescimento, citocinas, hormônios e fatores da matriz extracelular, alguns dos quais têm a capacidade de iniciar e modular os sinais intracelulares de Ca^{+2} nos hepatócitos (Guerra, 2011; Amaya, 2014). No presente estudo, demonstramos que o tratamento com lovastatina tem implicação durante a fase inicial da regeneração hepática (48 horas pós-hepatectomia), como demonstrado pelo atraso na recuperação da massa hepática em

animais tratados com o fármaco. Estes achados sugerem, que os *rafts* e o colesterol de membrana, por modularem diversos eventos de sinalização intracelular, inclusive a de insulina, interferem com a proliferação de hepatócitos por diminuir a sua reentrada no ciclo celular, como sugerem nossos dados de PCNA (FIGURA 18). No entanto, estudos adicionais são necessários para desvendar a importância dos *lipid-rafts* em cada fase específica de regeneração hepática, bem como o papel destas estruturas em diferentes tipos de células do fígado durante todo o processo de regeneração, já que outras células, como colangiócitos e células dendríticas, também apresentam importante papel no processo regenerativo.

O que já é sabido é que estatinas, tais como a lovastatina, podem induzir parada do ciclo celular na fase G1. Esta atividade antiproliferativa robusta permanece intacta em muitas células cancerosas (Vosper, 2015). Muitos estudos já demonstraram, que a lovastatina é um potente inibidor de diversos tipos celulares, entre eles linfócitos B, células gliais, células mesangiais etc. (Terada, 1998; Song, 2014; Choi, 1999). Além disto, a captação de glicose em células tratadas com estatinas também é significativamente reduzida, o que contribui para o efeito antiproliferativo deste fármaco (Malenda, 2012). Com relação à proliferação de células hepáticas, um estudo anterior demonstrou que a lovastatina, administrada oralmente numa dose baixa (15mg/kg/dia), reduziu eficientemente o tamanho e o número de nódulos pré-neoplásicos num modelo de carcinogênese química em fígado de ratos. A proliferação celular dentro dos nódulos do fígado foi reduzida para um terço em comparação com os controles (Bjorkhem-Bergman, 2010). Porém, os exatos mecanismos de como este fármaco inibiu a tumorigênese hepática ainda não foi explicado.

As alterações no conteúdo de colesterol e fluidez membranar ao longo do processo de regeneração hepática já foram demonstradas (revisado por Delgado-Coello, 2011). Os estudos iniciais dessas alterações, realizadas em fígados de ratos, detectaram diminuição na relação colesterol/fosfolípido das membranas dos hepatócitos e aumento da fluidez da membrana plasmática entre 15 e 24 horas após hepatectomia (Bruscalupi, 1980; Deliconstantinos, 1983). Além disso, em ratos, até 16-18 horas pós-hepatectomia, a composição da membrana plasmática do fígado não apresentou variação significativa, enquanto que a fluidez da membrana, medida como razão colesterol / fosfolípido, aumentou tanto quanto após 3 horas de hepatectomia parcial (Yoshida, 1993). Em 2-7 dias após hepatectomia foram detectados níveis reduzidos de colesterol e de fosfatidil-

etanolamina nas membranas, consistentes com o aumento da fluidez e com a taxa aparente de colesterol/fosfolípido (Abel, 2001). Poucos estudos foram realizados até agora, focando nas alterações nas balsas lipídicas que podem ocorrer após hepatectomia parcial. No entanto, é provável que as alterações no conteúdo lipídico desses microdomínios, responsáveis pela modulação de várias proteínas do tecido hepático, podem ter consequências drásticas no processo regenerativo. Este estudo foi o primeiro a demonstrar os efeitos de uma estatina na organização dos *rafts* no fígado, na sinalização de insulina intra-hepática e no processo de regeneração hepática. Os efeitos antiproliferativos da lovastatina foram observados após 48 horas da hepatectomia parcial, período esse de grande atividade mitótica dos hepatócitos remanescente. Tal efeito causou atraso da regeneração, provavelmente devido a déficits de sinalização celular mediada por receptores membranares gerados pela alteração do conteúdo de colesterol da membrana celular, como sugerem nossos dados.

O atraso na regeneração hepática devido ao uso das estatinas é de grande relevância quando extrapolamos nossos dados para casos de transplantes hepáticos e lobotectomia hepática. Um ponto importante a ser levantado é a utilização de fígados de pacientes doadores, que fazem uso de estatinas, para receptores que não fazem uso destas drogas. Seria a regeneração do órgão atrasada neste receptor? Até o momento, poucos estudos na literatura investigam a importância do uso de estatinas com pacientes submetidos ao transplante de fígado ou em processos regenerativos. Dado o grande número de pacientes que fazem uso indiscriminado dessas drogas, muitas vezes sem prescrição, entender melhor como as balsas de membrana regulam a proliferação hepática poderá fornecer evidências acerca de mecanismos moduladores importantes, o que aumentaria grandemente a sobrevida de pacientes que necessitam de rápida e funcional regeneração deste órgão.

6. CONCLUSÃO

6.CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que, uma vez dada a desorganização dos *lipid-rafts*, os efeitos mitogênicos e metabólicos da insulina no fígado são prejudicados. Sendo assim, a integridade e composição lipídica da membrana celular é de extrema importância para a sinalização de insulina, proliferação celular e regeneração hepática.

7. REFERÊNCIAS

1. Abel, S., Smuts, C. M., De Villiers, C. and Gelderblom, W. C. A. Changes in essential fatty acid patterns associated with normal liver regeneration and the progression of hepatocyte nodules in rat hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**. 22(5), 795-804, 2001.
2. Agius, L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. **Biochem J**. 414(1), 1-18, 2008.
3. Alt, J. R., Gladden, A. B. & Diehl, J. A. p21Cip1 promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. **J Biol Chem**. 277(10), 8517-8523, 2002.
4. Amaya, M. J., Oliveira, A. G., Guimarães, E. S., Casteluber, M. C., Carvalho, S. M., Andrade, L. M., ... & Menezes, G. B. The insulin receptor translocates to the nucleus to regulate cell proliferation in liver. **Hepatology**. 59(1), 274-283, 2014.
5. Baillat, G., Siret, C., Delamarre, E. and Luis, J. Early adhesion induces interaction of FAK and Fyn in lipid domains and activates raft-dependent Akt signaling in SW480 colon cancer cells. **Biochim Biophys Acta**. 1783(12), 2323-2331, 2008.
6. Banting, F.G. and Best, C.H. The Internal secretion of the pancreas. **J Lab Clin Med**. 7, 256-271, 1922.
7. Biedi, C., Panetta, D., Segat, D., Cordera, R. and Maggi, D. Specificity of insulin-like growth factor I and insulin on Shc phosphorylation and Grb2 recruitment in caveolae. **Endocrinology**. 144(12), 5497-5503, 2003.
8. Björkhem-Bergman, L., Acimovic, J., Torndal, U. B., Parini, P. and Eriksson, L. C. Lovastatin prevents carcinogenesis in a rat model for liver cancer. Effects of ubiquinone supplementation. **Anticancer Res**. 30(4), 1105-1112, 2010.
9. Blenis, J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. **Proc Natl Acad Sci USA**. 90, 5889-5892, 1993.

10. Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radzlejewska, E., Morgenbesser, S. D. *et al.* ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. **Cell.** 65(4), 663-675, 1991.
11. Brault, M., Ray, J., Gomez, Y. H., Mantzoros, C. S. and Daskalopoulou, S. S. Statin treatment and new-onset diabetes: a review of proposed mechanisms. **Metabolism.** 63(6), 735-745, 2014.
12. Brown, D. A. and Rose, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. **Cell.** 68, 533-544, 1992.
13. Brown, D.A. e London, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 14, 111-136, 1998.
14. Bruscalupi, G., Curatola, G., Lenaz, G., Leoni, S., Mangiantini, M. T., Mazzanti, L. *et al.* Plasma membrane changes associated with rat liver regeneration. **Biochim Biophys Acta.** 597(2), 263-273, 1980.
15. Carter, A. A., Gomes, T., Camacho, X., Juurlink, D. N., Shah, B. R. and Mamdani, M. M. Risk of incident diabetes among patients treated with statins: population based study. **BMJ.** 346:f2610, 2013.
16. Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouysségur, J. and Lenormand, P. ERK implication in cell cycle regulation. **Biochim Biophys Acta.** 1773(8), 1299-1310, 2007.
17. Choi, J. W. and Jung, S. E. Lovastatin-induced proliferation inhibition and apoptosis in C6 glial cells. **J Pharmacol Exp Ther.** 289(1), 572-579, 1999.
18. Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **J Lipid Res.** 38(11), 2264-2272, 1997.

19. Cohen, A. W., Combs, T. P., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P. Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 285(6), E1151-E1160, 2003.
20. De Meyts, P. and Whittaker, J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. **Nat Rev Drug Discov.** 1(10), 769-783, 2002.
21. Delgado-Coello, B., Briones-Orta, M. A., Macías-Silva, M. and Mas-Oliva, J. Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration. **Liver Int.** 31(9), 1271-1284, 2011.
22. Deliconstantinos, G. and Ramantanis, G. Alterations in the activities of hepatic plasma-membrane and microsomal enzymes during liver regeneration. **Biochem J.** 212(2), 445-452, 1983.
23. Denton, R. M. and Tavaré, J. M. Does Mitogen-Activated-Protein Kinase have a Role in Insulin Action? **Eur J Biochem.** 227(3), 597-611, 1995.
24. Denton, R. M., & Tavaré, J. M. (1995). Does Mitogen-Activated-Protein Kinase have a Role in Insulin Action? **Eur J Biochem.** 227(3), 597-611, 1995.
25. Di Guglielmo, G. M., Baass, P. C., Authier, F., Posner, B. I. and Bergeron, J. J. Insulin receptor internalization and signalling. **Mol Cell Biochem.** 182(1-2), 59-63, 1998.
26. Dolganiuc, A. Role of lipid rafts in liver health and disease. **World J Gastroenterol.** 17(20), 2520-2535, 2011.
27. Duncan, A.W., Dorrel, C. and Grompe, M. Stem cells and liver regeneration. **Gastroenterology.** 2009; 137: 466–81.
28. Echevarría, W., Leite, M. F., Guerra, M. T., Zipfel, W. R. and Nathanson, M. H. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. **Nature Cell Biol.** 5(5), 440-446, 2003.

29. Eichhorn, J., Kayali, A. G., Austin, D. A. and Webster, N. J. Insulin activates phospholipase C- γ 1 via a PI-3 kinase dependent mechanism in 3T3-L1 adipocytes. **Bioch and Bioph Res Comm.** 282(2), 615-620, 2001.
30. Fausto, N. Liver regeneration. **J Hepatol.** 32:19-31, 2000.
31. Fernández, M. A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Nixon, S. J., Ferguson, C., Kurzchalia, T. *et al.* Caveolin-1 is essential for liver regeneration. **Science.** 313(5793), 1628-1632, 2006.
32. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem.** 226(1), 497-509, 1957.
33. Foster, L.J., De Hoog, C.L. and Mann, M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 100: 5813–5818, 2003.
34. Furuchi, T. and Anderson, R. G. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). **J Biol Chem.** 273(33), 21099-21104, 1998.
35. Gey, G. O., & Thalhimer, W. Observations on the effects of insulin introduced into the medium of tissue cultures. **JAMA.** 82(20), 1609-1609, 1924.
36. Guerra, M.T., Fonseca, E.A., Melo, F.M. *et al.* Mitochondrial calcium regulates rat liver regeneration through the modulation of apoptosis. **Hepatology.** 54: 296–306, 2011.
37. Gustavsson, J., Parpal, S. and StrÅ, P. Insulin-stimulated glucose uptake involves the transition of glucose transporters to a caveolae-rich fraction within the plasma membrane: implications for type II diabetes. **Mol Med.** 2(3), 367, 1996.

38. Hata, S., Namae, M. and Nishina, H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. **Dev Growth Differ.** 49(2), 163-170, 2007.
39. Hissa, B., Duarte, J. G., Kelles, L. F., Santos, F. P., Helen, L., Gazzinelli-Guimarães, P. H. *et al.* Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. **PLoS Negl Trop Dis.** 6(3), e1583, 2012.
40. Holley, R. W. and Kiernan, J. A. Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: serum factors. **Proc Natl Acad Sci USA.** 71(7), 2908-2911, 1974.
41. Howe, L. R., Leever, S. J., Gómez, N., Nakielny, S., Cohen, P. and Marshall, C. J. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. **Cell.** 71(2), 335-342, 1992.
42. Hunter, T. Signaling — 2000 and beyond. **Cell.** 100, 113–127, 2000.
43. Kain, V., Kapadia, B., Misra, P. and Saxena, U. Simvastatin may induce insulin resistance through a novel fatty acid mediated cholesterol independent mechanism. **Sci Reports.** 5, 2015.
44. Kakio, A., Nishimoto, S. I., Yanagisawa, K., Kozutsumi, Y. and Matsuzaki, K. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. **J Biol Chem.** 276(27), 24985-24990, 2001.
45. Kanda, H. and Kitagawa, T. Hepatocarcinogenesis in terms of HGF and its receptor. **Nihon Rinsho.** 51(2), 380-385, 1993.
46. Kayali, A. G., Austin, D. A. and Webster, N. J. Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetes.** 49(11), 1783-1793, 2000.

47. Klein, U., Gimpl, G. and Fahrenholz, F. Alteration of the Myometrial Plasma Membrane Cholesterol Content with. beta.-Cyclodextrin Modulates the Binding Affinity of the Oxytocin Receptor. **Biochemistry**, 34(42), 13784-13793, 1995.
48. Koontz, J. W. and Iwahashi, M. Insulin as a potent, specific growth factor in a rat hepatoma cell line. **Science**. 211 (4485), 947-949, 1981.
49. Lalli, C. A., Pauli, J. R., Prada, P. O., Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Velloso, L. A. and Saad, M. J. A. Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet. **Metabolism**. 57(1), 57-65, 2008.
50. Leffert, H. L. Glucagon, insulin and their hepatic receptors: an endocrine pattern characterizing hepatoproliferative transitions in the rat. **Glucagon: Its role in physiology and clinical medicine**. 305-319, 1977.
51. Levis, G. M. and Evangelatos, G. P. Lipid composition of lymphocyte plasma membrane from pig mesenteric lymph node. **Biochem. J.** 156, 103–110, 1976.
52. Li, Y. C., Park, M. J., Ye, S. K., Kim, C. W., & Kim, Y. N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. **Am J Pathol**. 168(4), 1107-1118, 2006.
53. Lingwood, D., Kaiser, H.J., Levental, I. and Simons, K. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. **Biochemical Soc Trans**. 37, 955-960, 2009.
54. Liu, Y., Guo, X., Wu, L., Yang, M., Li, Z., Gao, Y *et al.*. Lipid rafts promote liver cancer cell proliferation and migration by up-regulation of TLR7 expression. **Oncotarget**. 7(39), 63856-63869, 2016.
55. Löw, P., Andersson, M., Edlund, C. and Dallner, G. Effects of mevinoxin treatment on tissue dolichol and ubiquinone levels in the rat. **Biochim Biophys Acta**. 1165(1), 102-109, 1992.

56. Malenda, A., Skrobanska, A., Issat, T., Winiarska, M., Bil, J., Oleszczak, B., ... & Staruch, A. D. Statins impair glucose uptake in tumor cells. **Neoplasia**. 14(4), 311-323, 2012.
57. Mather, J. P. and Sato, G. H. The growth of mouse melanoma cells in hormone-supplemented, serum-free medium. **Exp Cell Res**. 120(1), 191-200, 1979.
58. Mebratu, Y. and Tesfaigzi, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?. **Cell cycle**. 8(8), 1168-1175, 2009.
59. Michael, M. D., Kulkarni, R. N., Postic, C., Previs, S. F., Shulman, G. I., Magnuson, M. A. and Kahn, C. R. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. **Mol Cell**. 6(1), 87-97, 2000.
60. Michalopoulos, G. and H. C. Pitot. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes: morphological and biochemical observations. **Exp Cell Res**. 94.1: 70-78, 1975.
61. Michalopoulos, G. K. and DeFrances, M. C. Liver regeneration. **Science**. 276(5309), 60-66, 1997.
62. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. **Am J Pathol**. 176(1), 2-13, 2010.
63. Mohammed, F. F. and Khokha, R. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. **Trends Cell Biol**. 15(10), 555-563, 2005.
64. Mori, K., Mahmood, M. I., Neya, S., Matsuzaki, K. and Hoshino, T. Formation of GM1 ganglioside clusters on the lipid membrane containing sphingomyeline and cholesterol. **J Phys Chem B**. 116(17), 5111-5121, 2012.
65. Morino-Koga, S., Yano, S., Kondo, T., Shimauchi, Y., Matsuyama, S., Okamoto, Y., Suico, M.A., Koga, T., Sato, T., Shuto, T., Arima, H., Wada, I., Araki, E. and Kai,

- H. Insulin receptor activation through its accumulation in lipid rafts by mild electrical stress. **J Cell Physiol.** 228(2): 439-46, 2013.
66. Motoo, Y., Kobayashi, K. and Hattori, N. Effect of insulin on the growth of a human hepatoma cell line PLC/PRF/5: A possible role of insulin receptor. **Tohoku J Exp Med.** 156(4), 351-357, 1988.
67. Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V. and Simons, K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. **Proc Natl Acad Sci USA.** 92(22), 10339-10343, 1995.
68. Nagata, J., Guerra, M. T., Shugrue, C. A., Gomes, D. A., Nagata, N. and Nathanson, M. H. Lipid rafts establish calcium waves in hepatocytes. **Gastroenterology.** 133(1), 256-267, 2007.
69. Navarese, E. P., Buffon, A., Andreotti, F., Kozinski, M., Welton, N., Fabiszak, T. *et al.* Meta-analysis of impact of different types and doses of statins on new-onset diabetes mellitus. **Am J Cardiol.** 111(8), 1123-1130, 2013.
70. Nicou, A., Serriere, V., Hilly, M., *et al.* Remodelling of calcium signalling during liver regeneration in the rat. **J Hepatol.** 46: 247–56, 2007.
71. Palade, G. E. The fine structure of blood capillaries. **J Appl Phys** 24, 1424, 1953.
72. Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H. and Strålfors, P. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. **J Biol Chem.** 276(13), 9670-9678, 2001.
73. Parton, R. G. Caveolae and caveolins. **Curr Opin Cell Biol.** 8, 542–548, 1996.
74. Pike, L. J. and Casey, L. Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. **Biochem.** 41(32), 10315-10322, 2002.

75. Pilch, P. F., Meshulam, T., Ding, S. and Liu, L. Caveolae and lipid trafficking in adipocytes. **Clin Lipidol.** 6(1): 49-48, 2011.
76. Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E. and Parton, R. G. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. **J Cell Biol.** 152(5), 1057-1070, 2001.
77. Renkonen, O., Kaarainen, L., Simons, K. and Gahmberg, C. G. The lipid class composition of Semliki forest virus and plasma membranes of the host cells. **Virology.** 46, 318–326, 1971.
78. Resende, R., Guatimosim, S. e Leite, M.F. **Sinalização de Ca²⁺** . 1ª edição, Rio de Janeiro, Brasil, 2012.
79. Risselada, H.J. and Marrink, S.J. The molecular face of lipid rafts in model membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A** .105, 17367–17372, 2008.
80. Rodrigues, H. A., Lima, R. F., Fonseca, M. D. C., Amaral, E. A., Martinelli, P. M., Naves, L. A. *et al.* Membrane cholesterol regulates different modes of synaptic vesicle release and retrieval at the frog neuromuscular junction. **Eur J Neuro.** 38(7), 2978-2987, 2013.
81. Rodrigues, M. A., Gomes, D. A., Leite, M. F., Grant, W., Zhang, L., Lam, W. *et al.* Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. **J Biol Chem.** 282(23), 17061-17068, 2007.
82. Ruff-Jamison, S., Zhong, Z., Wen, Z., Chen, K., Darnell, J. E. and Cohen, S. Epidermal growth factor and lipopolysaccharide activate Stat3 transcription factor in mouse liver. **J Biol Chem.** 269(35), 21933-21935, 1994.
83. Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature.** 414 799–806, 2001.
84. Sanger F. Fractionation of oxidized insulin. **Biochem J.** 44, 126–128, 1949.

85. Sattar, N., Preiss, D., Murray, H. M., Welsh, P., Buckley, B. M., de Craen, A. *et al.* (2010). Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. **The Lancet**. 375(9716), 735-742, 2010.
86. Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A. C. and Land, H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. **Mol Cell Biol**. 17(9), 5588-5597, 1997.
87. Shah, V., Toruner, M., Haddad, F., Cadelina, G., Papapetropoulos, A., Choo, K. *et al.* Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. **Gastroenterology**. 117(5), 1222-1228, 1999.
88. Simons, K. and Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**. 387, 569–572, 1997.
89. Simons, K. and van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. **Biochemistry**. 6197–6202, 1988.
90. Simons, K. and Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 31-39, 2000.
91. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**. 175:720-31, 1972.
92. Singleton, P. A., Salgia, R., Moreno-Vinasco, L., Moitra, J., Sammani, S., Mirzapioazova, T. and Garcia, J. G. CD44 Regulates Hepatocyte Growth Factor-mediated vascular integrity: Role of c-Met, Tiam1/Rac1, Dynamin 2, And Cortactin. **J Biol Chem**. 282(42), 30643-30657, 2007.
93. Smart, E. J., Ying, Y. S., Donzell, W. C. and Anderson, R. G. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. **J Biol Chem**. 271(46), 29427-29435, 1996.

94. Song, X., Liu, B. C., Lu, X. Y., Yang, L. L., Zhai, Y. J., Eaton, A. F. *et al.* Lovastatin inhibits human B lymphoma cell proliferation by reducing intracellular ROS and TRPC6 expression. **Biochim Biophys Acta.** 1843(5), 894-901, 2014.
95. Stowe, N. T., Cressman, M. D., Brouhard, B. H., Nally, J. V., Vidt, D. G., Inman, S. R. *et al.* Lovastatin preserves renal function in experimental diabetes. **Am J Med Sci.** 317(4), 215-221, 1999.
96. Straus, D. S. Effects of insulin on cellular growth and proliferation. **Life Sci.** 29(21), 2131-2139, 1981.
97. Taniguchi, C. M., Aleman, J. O., Ueki, K., Luo, J., Asano, T., Kaneto, H. & Kahn, C. R. The p85 α regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase potentiates c-Jun N-terminal kinase-mediated insulin resistance. **Mol Cell Biol.** 27(8), 2830-2840, 2007.
98. Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. and Kahn, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 7(2), 85-96, 2006.
99. Tarlá, M. R., Ramalho, F., Ramalho, L. N. Z., Castro e Silva, T., Brandão, D. F., Ferreira, J. *et. al.* Cellular aspects of liver regeneration. **Act Cir Bras.** 21, 63-66, 2006.
100. Taub, M., Chuman, L., Saier, M. H. and Sato, G. Growth of Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCK) line in hormone-supplemented, serum-free medium. **Proc Natl Acad Sci USA.** 76(7), 3338-3342, 1979.
101. Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 5(10), 836-847, 2004.
102. Terada, Y., Inoshita, S., Nakashima, O., Yamada, T., Kuwahara, M., Sasaki, S. and Marumo, F. Lovastatin inhibits mesangial cell proliferation via p27Kip1. **J Am Soc Nephrol.** 9(12), 2235-2243, 1998.

103. Tobert, A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Nat Rev Drug Discov.** 2:517-526, 2003.
104. Touitou, R., Richardson, J., Bose, S., Nakanishi, M., Rivett, J. and Allday, M. J. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 α -subunit of the 20S proteasome. **The EMBO journal.** 20(10), 2367-2375, 2001.
105. Treisman, R. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. **Curr Opin Genet Dev.** 4(1), 96-101, 1994.
106. Tseng, J. H., Ouyang, C. H., Lin, K. J. and Yeh, T. S. Significance of insulin signaling in liver regeneration triggered by portal vein ligation. **J Surg Res.** 166(1), 77-86, 2011.
107. Vainio, S., Heino, S., Månsson, J. E., Fredman, P., Kuismanen, E., Vaarala, O. and Ikonen, E. Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. **EMBO rep.** 3(1), 95-100, 2002.
108. van Meer, G. Lipid traffic in animal cells. **Annu Rev Cell Biol.** 5, 247–275, 1989.
109. Vosper, J., Masuccio, A., Kullmann, M., Ploner, C., Geley, S. and Hengst, L. Statin-induced depletion of geranylgeranyl pyrophosphate inhibits cell proliferation by a novel pathway of Skp2 degradation. **Oncotarget.** 6(5), 2889-2902, 2015.
110. Wang, X., & Abdel-Rahman, A. A 2005. Effect of chronic ethanol administration on hepatic eNOS activity and its association with caveolin-1 and calmodulin in female rats. **Am J Physiol-Gastroint Liver Physiol.** 289(3), G579-G585, 2005.
111. Ward, C. W. and Lawrence, M. C. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. **Bioessays.** 31, 422–434, 2009.

112. Watson, R. T., Shigematsu, S., Chiang, S. H., Mora, S., Kanzaki, M., Macara, I. G., *et al.* Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. **J Cell Biol.** 154(4), 829-840, 2001.
113. Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E. and McMahon, M. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. **Mol Cell Biol.** 17(9), 5598-5611, 1997.
114. Woudenberg, J., Rembacz, K. P., van den Heuvel, F. A., Woudenberg-Vrenken, T. E., Buist-Homan, M., Geuken, M. *et al.* Caveolin-1 is enriched in the peroxisomal membrane of rat hepatocytes. **Hepatology.** 51(5), 1744-1753, 2010.
115. Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. **J Biophys Biochem Cytol.** 1, 445–458, 1955.
116. Yoshida, M., Tanaka, J., Tamura, J., Fujita, K. I., Kasamatsu, T., Kohmoto, M. and Tobe, T. Altered fluidity of liver plasma membranes following partial hepatectomy in rats. **J Surg Res.** 55(4), 390-396, 1993.
117. Zwick, E., Bange, J. and Ullrich, A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. **Endocr Relat Cancer.** 8(3), 161-173, 2001.
118. Xu, C., Chen, X., Chang, C. *et al.* Transcriptome analysis of hepatocytes after partial hepatectomy in rats. **Dev Genes Evol.** 220: 263–74, 2010.

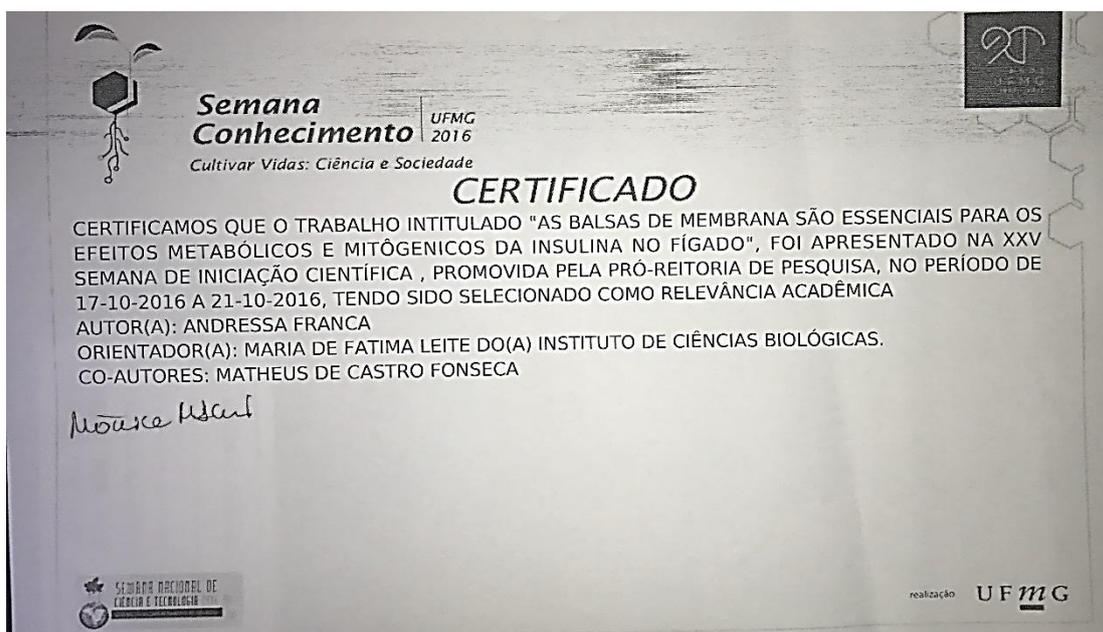
8. ANEXOS

PREMIAÇÕES E ARTIGOS PUBLICADOS/ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

Premiação na XXXI Reunião anual da FESBE com pôster de aluna de Iniciação Científica



Premiação na XXV Semana de Iniciação Científica da UFMG com Pôster de aluna de Iniciação Científica



Menção Honrosa na XXIV Encontro de Pesquisa e I Encontro de Inovação Tecnológica em Fisiologia e Farmacologia



Premiação na XXIV Encontro de Pesquisa e I Encontro de Inovação Tecnológica em Fisiologia e Farmacologia



Menção Honrosa na XXXI Reunião anual da FESBE



29/08 a
01/09/2016

Foz do Iguaçu

CERTIFICADO

Certificamos que o resumo intitulado

**DEPICTING CELL SIGNALING THROUGH THE DIFFERENT ISOFORMS OF INSULIN RECEPTOR
ON HEPATOCARCINOMA**

dos autores: MATHEUS DE CASTRO FONSECA, ANDRESSA FRANÇA, MARIA DE FATIMA LEITE

foi contemplado com Menção Honrosa pela brilhante apresentação na

XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE,

realizada no Centro de Convenções e Eventos do Bourbon Cataratas, Foz do Iguaçu, PR,

no período de 29 de agosto a 01 de setembro de 2016.

Comissão Organizadora

**Artigos Publicados/Aceitos para publicação e submetidos entre novembro /2014 e
fevereiro/2017**

REVIEW

Open Access



GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates

Matheus de Castro Fonseca¹, Carla J. Aguiar², Joao Antônio da Rocha Franco¹, Rafael N. Gingold¹ and M. Fatima Leite^{1*}

Abstract

Since it was discovered, the citric acid cycle has been known to be central to cell metabolism and energy homeostasis. Mainly found in the mitochondrial matrix, some of the intermediates of the Krebs cycle are also present in the blood stream. Currently, there are several reports that indicate functional roles for Krebs intermediates out of its cycle. Succinate, for instance, acts as an extracellular ligand by binding to a G-protein coupled receptor, known as GPR91, expressed in kidney, liver, heart, retinal cells and possibly many other tissues, leading to a wide array of physiological and pathological effects. Through GPR91, succinate is involved in functions such as regulation of blood pressure, inhibition of lipolysis in white adipose tissue, development of retinal vascularization, cardiac hypertrophy and activation of stellate hepatic cells by ischemic hepatocytes. Along the current review, these new effects of succinate through GPR91 will be explored and discussed.

Keywords: Succinate, GPR91, Cell functions, Cell signaling

Background

Back in the 1920's, succinate (succinic acid in blood pH), a dicarboxylic acid, was firstly correlated to a carbohydrate oxidation sequence proposed by Thorsten Thunberg, 1920 [1]. In the following decade, this sequence of oxidation was better described thanks to Albert von Szent-Györgyi's studies on pigeon breast muscle [2]. Consequently, succinate's catalytic role as a hydrogen carrier in aerobic respiration was discovered [2]. Then, in the late 1930's, Krebs described the core of aerobic respiration, the Krebs cycle – also referred to as tricarboxylic acid cycle or citric acid cycle [3]. With a few posterior details added, this cycle remains the best description of aerobic respiration to date [4]. Thereafter, for many decades succinate had been considered only as an intermediate of Krebs cycle, which was thought to be its single synthesis pathway.

Recent studies, however, demonstrated that succinate could be produced in nonenzymatic manners as well. This is possible because, under oxidative stress conditions, in which some enzymes of the Krebs cycle are

inhibited, α -ketoglutarate levels are alternatively generated via transamination. Its accumulation combined with inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase – from the Krebs cycle – leads to nonenzymatic decarboxylation of α -ketoglutarate into succinate [5]. It is noteworthy that in 1970, Krebs noticed that some of the Krebs' metabolites, including succinate, could accumulate in the interstitial space in case of ischemia, although the mechanisms and metabolic implications were not completely explained at the time [6]. Recently, Chouchani and colleagues (2014) described a mechanism by which extracellular concentration of succinate augments in case of ischemia (Fig. 1). ¹³C-isotopologue labelling assessments indicated that succinate was not generated by the common sources used in normoxia, which include glucose, glutamate, fatty acids and GABA (γ -aminobutyric acid) shunt. Moreover, these authors found that infusions of dimethyl malonate, the precursor of malonate – a competitive inhibitor of succinate dehydrogenase – caused decrease in succinate accumulation, altogether demonstrating that succinate increases during ischemia is due to succinate dehydrogenase reverse action, reducing fumarate – generated from malate/aspartate shuttle and the purine nucleotide cycle, since both this pathways are favored by ischemic conditions -

* Correspondence: leitemd@ufmg.br

¹Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG CEP: 31270-901, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 de Castro Fonseca et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

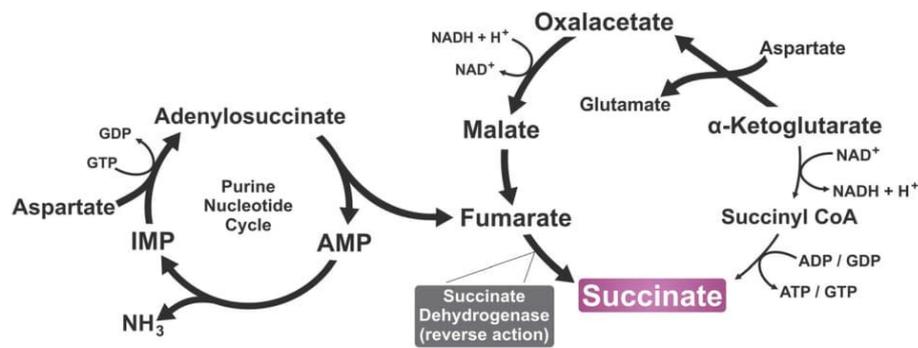


Fig. 1 Pathway of succinate accumulation during ischemia/reperfusion. Despite minor production via regular Krebs cycle - which is diminished due to excessive synthesis of NADH -, the reverse activity of succinate dehydrogenase has been shown to be the leading cause of succinate increase during ischemia. The sources of fumarate, which is then reduced into succinate, are mainly the Purine Nucleotide cycle - shown on the left - and the Malate/Aspartate Shuttle - similar to the Krebs cycle to run in reverse, which is favored by high levels of NADH

into succinate [7, 8], (Fig. 1). Thus, succinate is an important intermediate metabolite of the citric acid cycle that can be generated by different pathways within the mitochondria. In conditions linked to insufficient blood supply, such as ischemia, succinate is generated through a pathway distinct from Kreb's cycle, and its concentration at blood vessels might rise.

Hence, once accumulated within the mitochondrial matrix, succinate can migrate to the cytosol through dicarboxylate transporters located in the inner mitochondrial membrane. SLC25A10 (solute carrier family 25 member 10), a succinate-fumarate/malate transporter, is considered hitherto the responsible for this translocation. The second phase of transport, in which succinate crosses the outer mitochondrial membrane, is thought to happen by means of porins, namely, proteic channels through which various nonspecific molecules of less than 1.5 kDa may pass. Lastly, succinate has a fast efflux system into the bloodstream. The transporter, a protein named INDY (for I'm not dead yet, on account of its apparent relation to longevity), is a sodium-independent anion exchanger [9] (though previous studies considered it a sodium-coupled transporter) [10], which is able to switch dicarboxylates and citrate across the cell membrane.

Why are these alternative ways of succinate synthesis and its transport mechanism relevant? Mainly, because of the several functions attributed to succinate other than participating in the Krebs cycle, some of them - the ones on which this paper will focus - are associated with a G protein-coupled receptor, known as GPR91 or SUCNR1, which has succinate as its specific ligand [11]. Upon binding to such receptor, succinate has a hormone-like function acting in various organs and tissues such as blood cells, adipose tissue, liver, heart, retina, and kidneys - being expressed the most in these latter [11].

An overview on GPR91 and its expression pattern

GPR91 is a G-protein coupled receptor that acts as a sensor of extracellular succinate [11; reviewed in 12]. When it comes to the receptor structure, mutation experiments demonstrated that Arg⁹⁹, His¹⁰³, Arg²⁵² and Arg²⁸¹ play an important role in receptor function. These amino acids are all located in helices and agglomerate in the central area of the receptor - a rhodopsin-like structure - in a way that the positive charge attracts succinate [11]. We now show the result of an *in-silico* study of GRP91 and its possible succinate-binding site (Fig. 2). Although GPR91 is 33 % homologous to GPR99, a receptor linked to α -ketoglutarate, affinity assays have shown that succinate binds exclusively to GPR91, while α -ketoglutarate is a ligand for GPR99 [11]. In fact, the EC₅₀ values regarding succinate-GPR91 stimulation range from 20 to 50 μ m [11]. To test GPR91 ligand binding affinity, several substances, including pharmacological compounds for different GPCRs, and carboxylic acids close to succinate were tested. Some of them could also bind to GPR91, but with a much lower affinity compared to succinate [11-13]. Thus, it is now well accepted that succinate is the endogenous ligand for GPR91.

GPR91 interacts with multiple G-proteins. According to some studies using pertussis toxin, GPR91 can couple either with G_i or G_q, triggering different pathways and initiating distinct cellular effects. In HEK293 and MDCK (kidney derived cells), for example, succinate induces intracellular calcium release, inositol triphosphate formation, extracellular-signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) activation and decrease of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentration, which are signaling pathways induced by G_q or G_i coupling, depending only on succinate concentration [11]. In hematopoietic progenitor cells, however, signaling mediated exclusively by G_{i/o} leads to proliferation due to ERK1/2 activation [14]. In

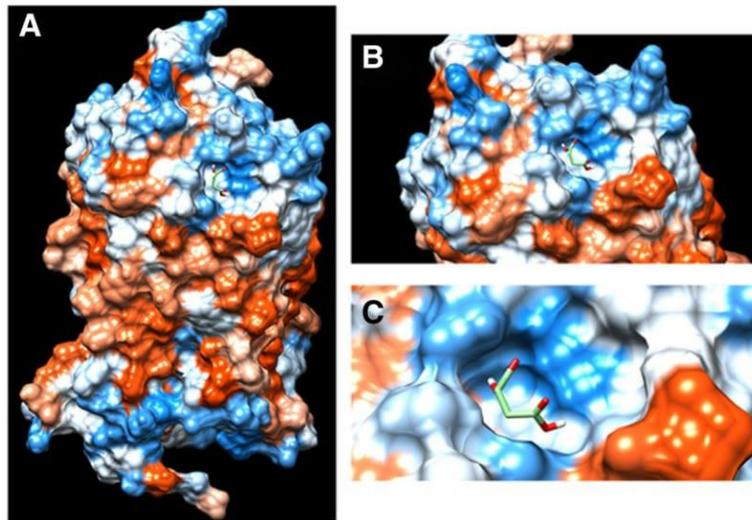


Fig. 2 Schematic model of the GPR91 active site. Surface representation of succinate binding at the active site with electrostatic potential (red, blue for negative and positive potential, respectively) computed with the GPR91 tool in Website Protein Data Bank (PDB). **a** through **c** represent consecutive higher magnifications of the succinate binding site on GPR91

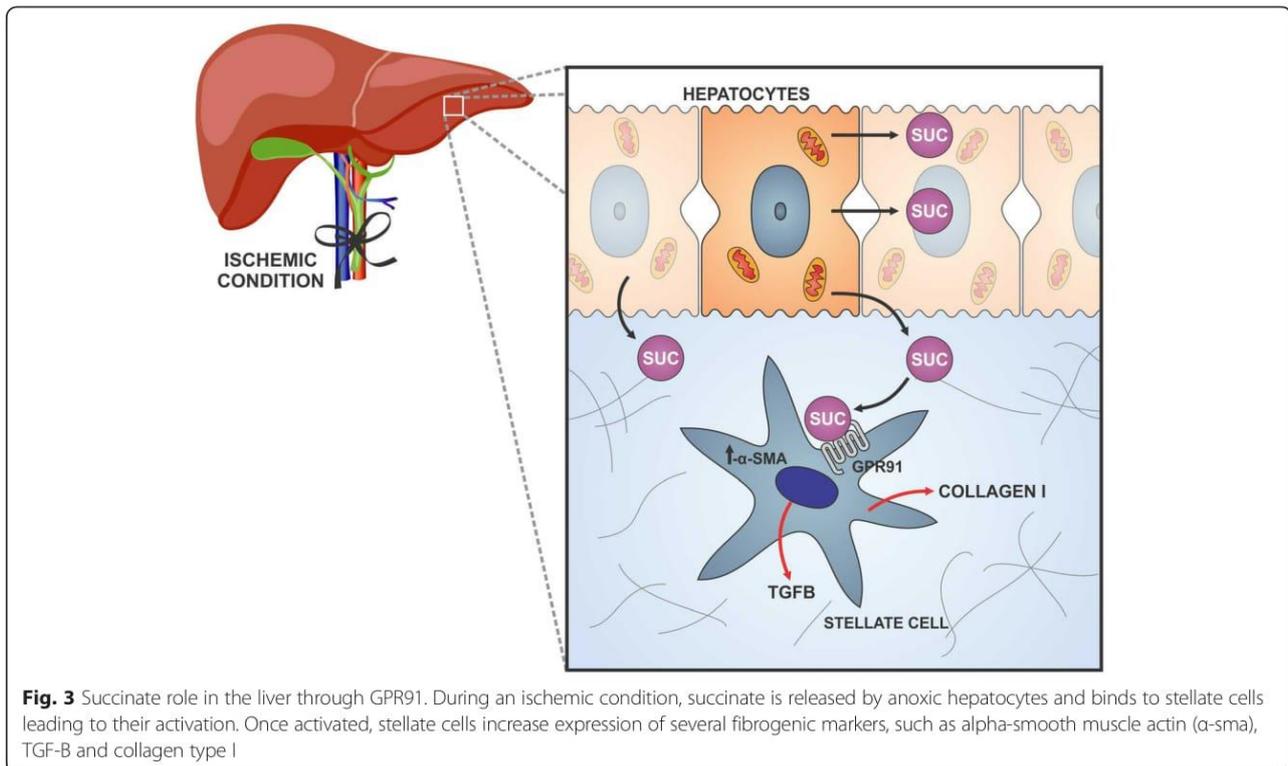
cardiomyocytes, succinate increases rather than decreases cAMP, leading to protein kinase A (PKA) activation, and suggesting that GPR91 coupling to Gs is also possible [15]. These distinct intracellular signaling pathways initiated by GPR91 activation indicate that succinate actions as a hormone can indeed be very diverse. Moreover, after triggering the signal transduction cascade, GPR91 is known to undergo internalization. Imaging studies indicated that GPR91 is located specifically on the plasma membrane, and is internalized and then desensitized as a result of ligand stimulation [11; reviewed in 12].

Although, GPR91 was initially characterized in the kidney, and shown to be highly expressed in liver, spleen and intestine [11], GPR91 is now known to be present throughout the body, including a variety of excitable as well as non-excitable cells. In the kidney, GPR91 localizes to the renal vascular lumen, in particular the afferent arteriole and the glomerular vasculature. Moreover, GPR91 is expressed in the luminal membrane of multiple segments of the renal tubules: the cortical thick ascending limb (CTAL) of Henle's loop, including the apical membrane of macula densa (MD), and the cortical and medullary collecting duct (CD) [16–18], but renin-producing juxtaglomerular cells (JGA), mesangial cells, and vascular smooth muscle cells that are key components of the JGA were found to be GPR91 negative [17]. In the liver, GPR91 is exclusively expressed in quiescent hepatic stellate cells (HSCs) [19], while in the heart ventricular cardiomyocytes express GPR91 in the sarcolemma membrane and T-tubules [15]. In the retina, GPR91 is predominantly expressed in the cell bodies of

the retinal ganglion cell (RGC) layer [20]. White adipocytes, hematopoietic progenitor cells [21] and multiple types of blood and immune cells were reported to express GPR91 [14, 22]. GPR91 was also detected in immature dendritic cells (DCs). Thus, since its characterization as the receptor for succinate in 2004 [11], GPR91 has been described in many cell types, and demonstrated to have a vast array of functions in the human body. Further details regarding the role of succinate through GPR91 in some of the aforementioned systems will be discussed below.

GPR91 signaling in the liver

The liver is targeted by a high number of growth factors and hormones that bind directly to hepatocytes or to other cell types such as HSCs. Many of these molecules (PDGF and TGF- β , for example) activate stellate cells during liver damage. Also, non-traditional signals such as matrix stiffness, metabolites and oxidative stress [23] are able to activate HSCs. A study published in 2007 by Correa and colleagues suggesting that succinate may behave as a metabolic sensor in the liver, has extended our comprehension of how liver injury can stimulate succinate production and consequent HSC activation [19]. According to Correa et al., 2007, *in vitro* ischemia-reperfusion in rodent livers, allowed detection of succinate in extracellular fluids, and this phenomenon played an important role in the activation of HSCs (Fig. 3). The same group showed that, in the liver, GPR91 is expressed primarily in the quiescent stellate cell and this expression is lost when stellate cells are activated. On the other hand, Li et al., 2015 showed that in the presence of succinate, HSCs present an



increased GPR91 expression followed by a 2-fold increase in the differentiation rate, thus leading to their activation [24].

In addition, Li and colleagues 2015, expanded the previous finding, by demonstrating the specific molecular effects of succinate in the activation of HSCs. On a study using *in vitro* and *in vivo* models, it was shown that HSCs cultured and treated directly with succinate or with inhibitors of succinate dehydrogenase (malonate, palmitate/choline and methionine-choline deficient media), caused not only an increase in expression of GPR91, but also of alpha-smooth muscle actin (α -sma), TGF-B and collagen type I, markers of a fibrogenic response [24] (Fig. 3). On the other hand, transfection of these cells with siRNA for GPR91 abrogated α -sma production induced by succinate, indicating the specificity of the pro-fibrogenic responses to GPR91 signaling. In the *in vivo* studies, HSCs isolated from hepatosteatotic mice, fed with a methionine and choline deficient diet, released a higher level of succinate and expressed more GPR91 and α -sma as well. Taking together, these findings indicate a succinate-GPR91 coupling dependence in HSCs activation and fibrogenesis. Therefore, GPR91 might play a relevant role in liver homeostasis, being a possible therapeutic target for modulation of hepatic functions. Blocking GPR91 during liver transplantation could, for instance, avoid undesirable fibrogenic reactions.

GPR91 signaling in retina

Besides liver injury, succinate effects through GPR91 activation have been demonstrated in a very delicate and well-specialized structure such as retina, which owns a vast vascular plexus responsible for its metabolic requirements [25]. In certain conditions, a misbalance between tissue demand for oxygen and nutrients and vascular supply results in hypoxic retina, leading to a detrimental pre-retinal and intravitreal neovascularization. Since vascular supply is coupled to tissue metabolic rate, and succinate accumulates under conditions of insufficient oxygen supply [26, 27], the role of succinate in retinal neovascularization induced by hypoxia was investigated. It was found that in ischemic retinas of rats subjected to oxygen-induced retinopathy, succinate levels rise without a joint increased expression of GPR91, which maintained its levels in retinal ganglion neurons (the main retinal structure where GPR91 is localized) [20]. In addition, succinate induced a prominent development in retinal vascularization and vascular density, an effect significantly suppressed by siRNA to GPR91. In this report, Sapielha and colleagues, 2008, showed that the role of succinate in this system is to induce an autocrine activation of retinal ganglion neurons by its binding to GPR91. Therefore, in response to augmented succinate levels, these cells regulate the production of an array of angiogenic factors including the vascular endothelial growth factor (VEGF) through a specific activation of

GPR91. Of note, there is no participation of a hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a)-dependent pathway (Fig. 4). Accordingly, succinate showed no effect on rats that are deficient in retinal ganglion neurons, confirming the importance of these cells in orchestrating GPR91-succinate-dependent neovascularization. Conversely to succinate effects, Semaphorin 3A (a class of secreted and membrane protein that acts as an axonal growth cone guidance molecule) has been suggested as an opposite force to neovascularization [28]. Joyal et al., 2011, suggested that this molecule promotes vascular decay and later forms a chemical barrier that repels neo-vessels toward the vitreous [28].

Adding on the succinate effects on retinal neovascularization described above, Hu et al., 2013 have shown that GPR91 also regulates VEGF production in the retinal cell line RGC-5 through its direct incubation with succinate or a high-glucose medium [29]. In addition, ERK1/2 and JNK signaling pathways may be involved in the effects of GPR91-mediated high glucose-induced VEGF release in RGC-5 cells. A very recent work from the same group reinforced these findings. Using RGC-5 cells, Hu et al., 2015, demonstrated that GPR91 mediates VEGF secretion and endothelial cell proliferation, possibly by activating the ERK1/2 and JNK signaling pathways and then upregulating COX-2 (Cyclooxygenase 2) and PGE2 (prostaglandin E2) expression [30]. Since COX-2 gene encodes a cytosolic protein that is upregulated throughout inflammation and may contribute to local ischemia and hypoxia, a higher COX-2 expression

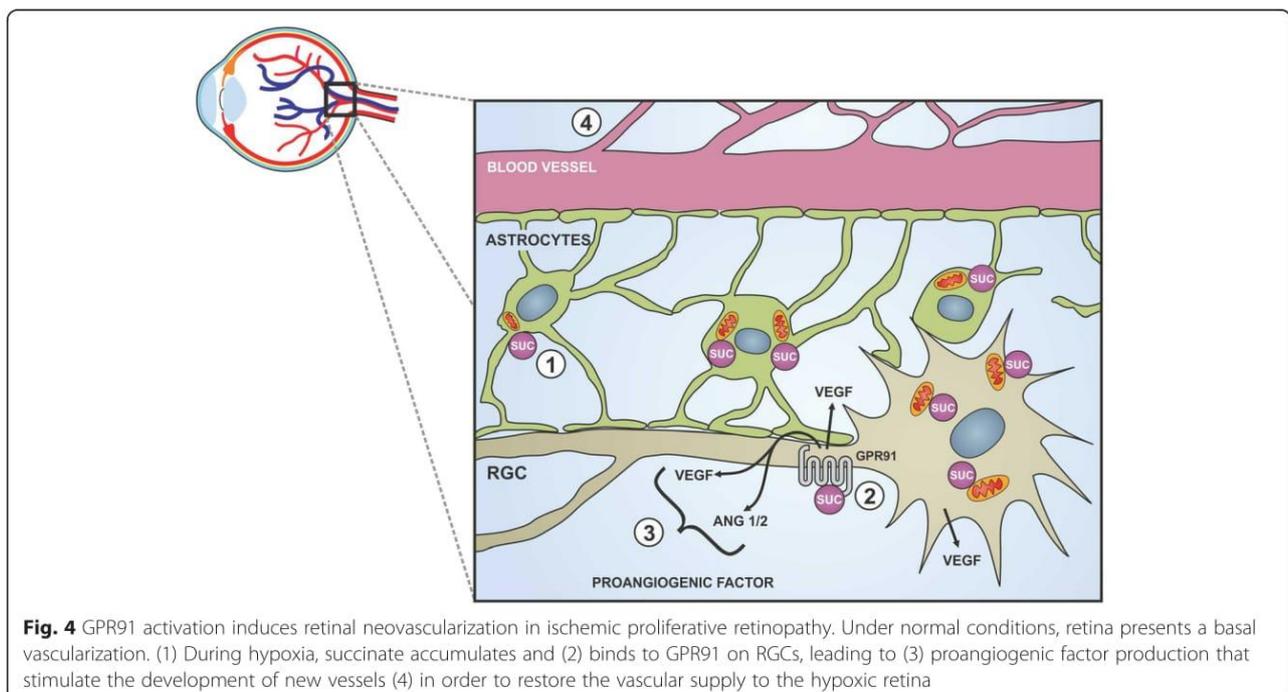
suggests that inflammation has an important part in the incidence and evolution of diabetic retinopathy [30].

In summary, strong evidence has put succinate/GPR91 as an important signaling pathway to activate the development of new blood vessels in retina during a hypoxic condition and modulation of VEGF release through this process might be a possible target for therapy.

GPR91 signaling and metabolism

The effects of GPR91 signaling pathways on metabolism were first demonstrated by Sadagopan, 2007. By using rodent models of diabetes, obesity and hypertension, it was demonstrated that circulating succinate levels in these animals are elevated compared to non-diseased controls [31]. However, the mechanisms that lead to this increase in succinate concentration remain unclear. Contrary to what was observed in rodents, neither hypertension nor diabetes was associated with a rise in circulating succinate in human blood samples [31]. While these observed differences were not elucidated yet, another study using blood samples from patients that underwent liver transplantation showed increased levels of succinate as early as 2 h post-transplant, which was also observed 6 h after transplant [15].

More recently, McCreath and colleagues, 2015, showed that GPR91 is vastly expressed in the white adipose tissue of mice and regulates adipose mass and glucose homeostasis [32]. By generating a GPR91 mutant mouse, it was shown that loss of succinate receptor leads to dichotomous effects on metabolism and total body weight, with no



difference of weight among organs, but with a marked difference on the cumulative fat content [32]. On a regular diet, *Sucnr1*^{-/-} mice present a smaller white adipose tissue compartment, smaller adipocytes, increased energy expenditure and an improved glucose buffering. Although it could be thought that decreased expression of GPR91 would lead to a reduced expression of genes related to adipocyte differentiation, deletion of GPR91 did not alter adipogenesis but rather resulted in diminished lipid accumulation and smaller adipocyte size. These results were further evaluated by the VO₂ test, to investigate the metabolic changes caused by GPR91 deletion. As expected, the rate of VO₂ consumption was reduced in *Sucnr1*^{-/-} mice compared to WT counterparts. In contrast, feeding *Sucnr1*^{-/-} mice with a high fat diet leads to increased fat deposition, hyperglycemia, reduced insulin secretion and an augmented hepatocyte damage compared to wild-type (WT) littermates. Thereby, these findings put GPR91 as a sensor for dietary energy, being a possible target for therapeutics on obesity, hypertension and diabetes.

GPR91 signaling in the heart

Succinate is an important molecule for the maintenance or disturbance of cardiovascular status, specially blood pressure and cardiac muscle thickness. In 2010, Aguiar and collaborators showed that GPR91 is expressed in ventricular cardiomyocytes, in the sarcolemmal membrane, and in T-Tubules [33]. Because the GPR91 receptor is expressed in cardiomyocytes, and cardiac function is an important determinant of blood pressure and other aspects of cardiovascular homeostasis, there was an urge to investigate the role of succinate through cardiac GPR91. Aguiar et al. in 2010 showed that succinate could directly activate GPR91 in cardiomyocytes, affecting the pattern of intracellular Ca²⁺ release and Ca²⁺ re-uptake. It was demonstrated that proteins such as phospholamban and ryanodine receptor, both well known to be involved in the dynamic of cardiomyocyte Ca²⁺ release, are activated by succinate/GPR91 interaction. These effects were triggered by adenylyl cyclase and consequently PKA activation, resulting in cardiomyocyte apoptosis [33], an event that was prevented by PKA inhibitor. Together, these results confirmed that succinate could indeed, at high concentration, lead to cardiomyocyte cell death. Moreover, these data suggested that increased levels in serum succinate, which could be triggered for instance in ischemic conditions, might represent an important cause of cell death in the heart.

Furthermore, in 2014 it was demonstrated that long-term exposure to succinate could lead to cardiomyocyte hypertrophy [15]. Since activation of GPR91 in kidney can increase blood pressure through the renin-angiotensin system (RAS) [11], the question remained whether cardiac hypertrophy, induced by high levels of succinate in the

blood stream, was a consequence of succinate-induced changes in mean arterial blood pressure (MAP) through RAS activation, rather than a direct effect of succinate through GPR91 in the heart. It was found that MAP was unaffected after two days of succinate treatment, but slightly increased at day 4, and reverted to normal values on the final day of the experiment indicating that the observed hypertrophy induced by succinate was therefore not entirely due to an increase in MAP, but could involve other mechanisms as well [15]. Moreover, echocardiography experiments in rodents, in the presence or absence of losartan, which is an antagonist for the angiotensin II receptor AT-1, demonstrated that losartan abolished succinate-induced increase in blood pressure but did not alter the most relevant echocardiographic parameter for measuring hypertrophy (left ventricular posterior wall thickness - LVPW). These findings were consistent with previous results that showed that succinate could induce RAS activation, but also indicated that succinate-induced hypertrophy was not solely caused by variations in MAP. To connect cardiac hypertrophy to succinate-GPR91 activation, experiments with GPR91-KO mice were performed and showed an increase in left ventricular posterior wall only in wild type mice, but not in GPR91-KO mice. These findings demonstrated that GPR91 is essential for succinate-induced cardiomyocyte hypertrophy. Taken together, these results show that upholding levels of serum succinate can cause cardiac hypertrophy through direct activation of GPR91. However, the fact that losartan reversed some of the other observed hypertrophic effects (besides LVPW) also suggests that succinate-induced remodeling of cardiac muscle involves direct effects of GPR91 in cardiac cells, but also succinate effects in other organs.

The intracellular signaling events by which GPR91 activation causes cardiac hypertrophy were thus established, using primary culture of neonatal cardiomyocytes [15]. It was shown that upon binding to GPR91, succinate causes CaMKII δ and ERK1/2 activation, culminating in the transcription of genes related to cardiac hypertrophy [15], (Fig. 5). Succinate/GPR91 activates phospholipase C, which generates inositol 3,4,5-triphosphate (IP₃) and triggers intracellular Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum (ER). Cytoplasmic Ca²⁺ then activates CaMKII δ , which phosphorylates histone deacetylase 5 (HDAC5), translocating it out of the nucleus, facilitating the transcription of hypertrophic genes (Fig. 5). Additionally, GPR91 activates MAPK, which phosphorylates ERK1/2. Phosphorylated ERK1/2 (pERK 1/2) translocates to the nucleus, where it also induces cardiac hypertrophy through the aforementioned hypertrophic cellular signaling cascades in cardiomyocytes. Other mechanisms, still not explored, might likewise be involved in succinate/GPR91-induced cardiomyocyte hypertrophy.

kidney, especially in the afferent arteriole and the glomerular vasculature, where succinate acts through the highly expressed GPR91, increasing Ca^{2+} transient and releasing PGE2, PGI2 (prostacyclin 2) and NO (nitric oxide), which causes renin release in the JGA [19]. A recent microperfusion study has shown that perfusion of the glomeruli with a succinate buffer induces renin release from the JGA and vasodilation of the glomerular afferent arterioles, which abides by the affirmation that succinate has an essential role in glomerular hyperfiltration and RAS activation.

These data suggest that succinate not only has a very important role in blood pressure regulation in ischemic events, but could also be a possible target for novel therapies to control hypertension. For example, post-ischemic transplanted patients could receive GPR91 antagonists to prevent a possible increase in MAP during recovery. That strategy, combined with known treatments for prevention of post operational hypertension, could reduce the cardiovascular risk for other chronic conditions such as arteriosclerosis and aneurisms, both implicated in long-term increases in blood pressure.

Perspectives in the succinate/GPR91 field

Some evidence has pointed succinate as an 'alarming' signal able to trigger GPR91 to sense immunological danger, causing increased allograft rejection during organ transplantation [21]. As described above, blood level of succinate is increased in the serum of patients after liver transplant [15]. Also, a deficiency on mitochondrial succinate cytochrome C reductase, a genetic condition that leads to an increase in succinate levels on serum, is reported as a need for special attention in transplant procedures, since the donor could possibly transfer this inherited metabolic disorder to the recipient [34]. This is a fundamental concern when the donor has parental consanguinity, an increasing factor for autosomal recessive illnesses such as the above-mentioned one. In addition, a multiorgan failure has been reported in a liver-intestine transplant from a pediatric donor with a succinate- cytochrome C-reductase deficiency, a condition that would lead to an increase in blood succinate level. It has also been demonstrated that a patient with succinate dehydrogenase deficiency, another condition that also leads to extracellular accumulation of succinate, exhibited congestive heart failure [35]. Then, GPR91 antagonism in preservation solution for transplantation could represent, for instance, a real benefit to help preventing rejection or other complications.

Thereby, succinate may be a clinical marker for ischemia, and its increase in blood level due to organ transplant should be avoided.

Conclusions

Since the discovery and characterization of GPR91 - a G-protein couple receptor for succinate - a decade ago, succinate signaling through GPR91 increased our understanding of body functions. It is worth to mention that succinate is now more than sole participant as a metabolic intermediate. It is known that circulating succinate, through GPR91 activation, is extensively involved in several physio-pathological functions, as shown along this review. Thus, succinate may be considered a signaling molecule with a hormone-like function. Since blood succinate level increase mainly due to ischemia/reperfusion, an emerging application during organ transplantation becomes evident. Therefore, understanding better the participation of Krebs cycle intermediates, as signaling molecules, and their relative contribution to each physiological process in which they might be involved, may lead to a clearer understanding of cell function, and to more accurate clinical interventions when necessary.

Abbreviations

AT-1: Angiotensin II receptor type 1; CaMKII δ : Calcium Calmodulin Kinase II δ ; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; COX-2: Cyclooxygenase 2; DC: Dendritic cell; EP2/4: Prostaglandin receptors 2/4; ER: Endoplasmic Reticulum; ERK1/2: Extracellular-signal-regulated kinases 1/2; GABA: γ -aminobutyric acid *sn*cr1; GPR91: G protein-coupled receptor 91; GPR99: G protein-coupled receptor 99; HDAC5: Histone Deacetylase 5; HIF1a: Hypoxia induced factor 1a; HSC: Hepatic stellate cell; IP3: Inositol 3,4,5-triphosphate; JGA: Juxtaglomerular apparatus; JNK: c-Jun N-terminal kinases; LVPW: Left ventricular posterior wall; MAP: Mean arterial blood pressure; MD: Macula densa; PDGF: Platelet-derived growth factor; PERK 1/2: Phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2; PGE2: Prostaglandin E2; PGI2: Prostacyclin 2; PKA: Protein kinase A; CTAL: Cortical thick ascending limb; RAS: Renin-angiotensin system; RGC: Root ganglion cell; siRNA: Small interference ribonucleic acid; SUCNR: Succinate receptor; TGF β : Transforming growth factor beta; VEGF: Vascular endothelial growth factor; VO2: Oxygen consumption; WT: Wild-type.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MFL conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. MFL, MC, CJA, JR, RG participated in the design of the study. All the authors equally contributed to the writing process, reading and approving of the final manuscript.

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical assistance of Gilson Nogueira and Dr. M. J. Amaya (Yale University, USA) for carefully reading the manuscript. This work was supported by grants from CAPES, FAPEMIG, and CNPq.

Author details

¹Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG CEP: 31270-901, Brazil. ²Centro Universitário Estácio de Sá, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Received: 19 October 2015 Accepted: 4 January 2016

Published online: 12 January 2016

References

1. Thunberg T. Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels und der dabei wirksamen. *Enzyme Skandinavisches Archiv für Physiologie*. 1920;40:1–91.
2. Annan G, Banga I, Blazsó A, Bruckner V, Laki K, Straub B, et al. Über die Bedeutung der Fumarsäure für die tierische Gewebeatmung. *Einleitung*,

- übersicht, Methoden Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie. 1935;236:1–20.
3. Krebs HA, Johson WA. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia*. 1937;4:148–56.
 4. Krebs HA. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect Biol Med*. 1970; 14:154–70.
 5. Fedotcheva NI, Sokolov AP, Kondrashova MN. Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2006; 41:56–64.
 6. Brosnan JT, Krebs HA, Williamson DH. Effects of Ischaemia on Metabolite Concentrations in Rat Liver. *Biochem J*. 1970;117:91–6.
 7. Taegtmeyer H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. *Circ Res*. 1978;43:808–15.
 8. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014;515(7527):431–5.
 9. Knauf F, Rogina B, Jiang Z, Aronson PS, Helfand SL. Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene *Indy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:14315–9.
 10. Inoue K, Fei YJ, Zhuang L, Gopal E, Miyauchi S, Ganapathy V. Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biochem J*. 2004;378:949–57.
 11. He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004;429(6988):188–93.
 12. Ariza AC, Deen PM, Robben JH. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol*. 2012;00022:1664–2392.
 13. Bhuniya D, Umrani D, Dave B, Salunke D, Kukreja G, Gundu J, et al. Discovery of a potent and selective small molecule hGPR91 antagonist. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(12):3596–602.
 14. Hakak Y, Lehmann-Bruinsma K, Phillips S, Le T, Liaw C, Connolly DT, et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2009;85:837–43.
 15. Aguiar CJ, Rocha-Franco JA, Sousa PA, Santos AK, Ladeira M, Rocha-Resende C, et al. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Commun Signal*. 2014;12(1):78.
 16. Toma I, Kang JJ, Sipos A, Vargas S, Bansal E, Hanner F, et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest*. 2008;118:2526–34.
 17. Vargas SL, Toma I, Kang JJ, Meer EJ, Peti-Peterdi J. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(5):1002–11.
 18. Robben JH, Fenton RA, Vargas SL, Schweer H, Peti-Peterdi J, Deen PM, et al. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int*. 2009;76(12):1258–67.
 19. Correa PRAV, Krulog EA, Thompsom M, Leite MF, Dranoff JA, Nathanson M. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatology*. 2007;47:262–9.
 20. Sapielha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med*. 2008;14(10):1067–76.
 21. Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol*. 2008;9:1261–9.
 22. Macaulay IC, Tijssen MR, Thijssen-Timmer DC, Gusnanto A, Steward M, Burns P, et al. Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood*. 2007;109:3260–9.
 23. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000;275(4):2247–50.
 24. Li YH, Woo SH, Choi DH, Cho EH. Succinate causes α -SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 463:853–8.
 25. Adair TH, Gay WJ, Montani JP. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *Am J Physiol*. 1990;259:393–404.
 26. Folbergrova J, Ljunggren B, Norberg K, Siesjo BK. Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain Res*. 1974;80: 265–79.
 27. Hoyer S, Krier C. Ischemia and aging brain. Studies on glucose and energy metabolism in rat cerebral cortex. *Neurobiol Aging*. 1986;7:23–9.
 28. Joyal JS, Sitaras N, Binet F, Rivera JC, Stahl A, Zaniolo K, et al. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood*. 2011;117:6024–35.
 29. Hu J, Wu Q, Li T, Chen Y, Wang S. Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. *Exp Eye Res*. 2013;109:31–9.
 30. Hu J, Li T, Du S, Chen Y, Wang S, Xiong F, et al. The MAPK signaling pathway mediates the GPR91-dependent release of VEGF from RGC-5 cells. *Int J Mol Med*. 2015;36(1):130–8.
 31. Sadagopan N, Li W, Roberds SL, Major T, Preston GM, Yu Y, et al. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am J Hypertens*. 2007;20(11):1209–15.
 32. McCreath KJ, Espada S, Gálvez BG, Benito M, de Molina A, Sepúlveda P, et al. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes*. 2015;64(4):1154–67.
 33. Aguiar CJ, Andrade VL, Gomes ER, Alves MN, Ladeira MS, Pinheiro AC, et al. Succinate modulates Ca(2+) transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell Calcium*. 2010;47(1):37–46.
 34. Zucker AR, Gondolesi GE, Abbott MA, Decker R, Rosengren SS, Fishbein TM. Liver-intestine transplant from a pediatric donor with unrecognized mitochondrial succinate cytochrome C reductase deficiency. *Transplantation*. 2005;79(3):356–8.
 35. Davili Z, Johar S, Hughes C, Kveselis D, Hoo J. Succinate dehydrogenase deficiency associated with dilated cardiomyopathy and ventricular noncompaction. *Eur J Pediatr*. 2007;166:867–70.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



NANO EXPRESS

Open Access



Biocompatible Fluorescent Core-Shell Nanoconjugates Based on Chitosan/ Bi_2S_3 Quantum Dots

Fábio P. Ramanery¹, Alexandra A. P. Mansur¹, Herman S. Mansur^{1*}, Sandhra M. Carvalho^{1,2} and Matheus C. Fonseca³

Abstract

Bismuth sulfide (Bi_2S_3) is a narrow-bandgap semiconductor that is an interesting candidate for fluorescent biomarkers, thermoelectrics, photocatalysts, and photovoltaics. This study reports the synthesis and characterization of novel Bi_2S_3 quantum dots (QDs) functionalized using chitosan (CHI) as the capping ligands via aqueous “green” route at room temperature and ambient pressure. Transmission electron microscopy (TEM), UV-visible (UV-vis) spectroscopy, photoluminescence (PL) spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), and zeta potential (ZP) analysis were used to characterize the hybrids made of biopolymer-functionalized Bi_2S_3 semiconductor nanocrystals. The results demonstrated that the CHI ligand was effective at nucleating and controlling the growth of water-soluble colloidal Bi_2S_3 nanoparticles. The average sizes of the Bi_2S_3 nanoparticles were significantly affected by the molar ratio of the precursors but less dependent on the pH of the aqueous media, leading to the formation of nanocrystals with average diameters varying from 4.2 to 6.7 nm. These surface-modified Bi_2S_3 nanocrystals with CHI exhibited photoluminescence in the visible spectral region. Moreover, the results of in vitro MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay with human osteosarcoma cells (SAOS) cell line demonstrated no cytotoxic response of the nanoconjugates. Furthermore, the results indicated that the Bi_2S_3 QD–CHI nanoconjugates showed HEK293T cell uptake; therefore, they can be potentially used as novel fluorescent nanoprobe for the in vitro bioimaging of cells in biomedical applications.

Keywords: Nanoparticles, Nanoconjugates, Chitosan, Nanomaterial, Core-shell nanostructure

Background

In recent years, the field of colloidal semiconductor nanocrystals, also referred to as colloidal quantum dots (QDs), has grown rapidly. The developments are the result of significant advances in nanoscience and nanotechnology that predominantly focus on biomedical and environmental applications [1]. The interdisciplinary contributions from several areas such as materials science, chemistry, and physics, combined with biology, pharmaceuticals, medicine, and environmental science

have created a fascinating new class of hybrid nanomaterials or nanoconjugates. These nanomaterials can be designed and engineered with almost any property or to carry out almost any function [2]. Basically, these nanosized conjugates combine the intrinsic functions of inorganic semiconductor nanomaterials and the versatile organic biointerfaces offered by polymers (e.g., chitosan, PVA, PEG) and biomolecules (e.g., amino acids, peptides, proteins, DNA) [3, 4]. In the realm of inorganic *low-dimensional* materials for producing nanoconjugates and nanostructures, QDs have been the major choice because of their unique combination of optical, electronic, magnetic, and chemical properties, which can be tuned via the modification of the nanoparticle size below the threshold value, named the Bohr radius [1, 5, 6]. In particular, the interest in

* Correspondence: hmansur@demet.ufmg.br

¹Center of Nanoscience, Nanotechnology and Innovation - CeNano², Department of Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627-Escola de Engenharia, Bloco 2-Sala 2233, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

narrow-bandgap materials such as bismuth chalcogenides (e.g., Bi_2X_3 , X = S, Se, Te) nanocrystals has intensified in recent years [7, 8]. Studies from around the world suggest that these materials are realistic prospects for applications including solar cells, infrared optoelectronics (e.g., lasers, optical modulators, photo-detectors, and photoimaging devices), low-cost/large-format microelectronics, and biological imaging and biosensor systems [7, 9].

However, due to their extremely low dimensions at the nanoscale and exceptionally high surface-area-to-volume ratio, these fluorescent nanocrystals must be stabilized by capping agents during their synthesis to restrict the growth of formed nuclei [10]. Hence, QDs have been produced using numerous processes such as in the pioneer studies entrapped in glasses [11, 12] or molecular films [13], encapsulated in polymer nanoparticles [14], dispersion in organic solvents [15], and colloidal dispersions [16, 17].

Nevertheless, despite almost three decades of advances in QD synthesis, the majority of the reported methods rely on organometallic processing routes that employ toxic solvents at high temperature and that lead to the formation of nanocrystals with hydrophobic surfaces [1, 5, 18]. Thus, synthesis of semiconductor QDs using an aqueous colloidal process is an attractive alternative to organometallic routes, which have received increasing concern because of their use of chemical processes that can be harmful to humans and to the environment [17, 19, 20]. In support of this, new environmentally friendly processes for producing QDs have been reported recently in the literature. Most studies employ the use of water-based colloidal routes using environmentally friendly and biocompatible reagents and precursors at low temperatures [17, 21]. In addition, colloidal chemistry provides a flexible platform for the surface functionalization of the QDs by applying an appropriate capping ligand, which in turn can simultaneously stabilize the inorganic semiconductor core of the nanoparticles and form an organic shell with biochemical functionalities for further applications [19].

Among several alternatives for capping agents, biopolymers, such as chitosan and its derivatives, have recently been proposed as a greener nanopatform for producing water-soluble quantum dots. These polymers are intrinsically biocompatible, and they can be directly used as ligands for stabilizing QDs in aqueous media [22]. Chitosan is a natural biopolymer that is commonly produced from the alkaline deacetylation of chitin, which is mostly extracted from the exoskeleton of marine crustaceans. As a biopolymer, it has been broadly used in numerous biomedical and environmental applications due to its biocompatibility, biodegradability, commercial availability, and worldwide abundance

associated with its eco-friendly properties [20]. Surprisingly, few studies have reported the preparation of nanomaterials based on bismuth sulfide (Bi_2S_3), such as quantum dots [7] and nanorods [9, 23], but no research investigating Bi_2S_3 -chitosan nanoconjugates was found in the consulted literature.

Thus, in this study, new carbohydrate-based nanoconjugates combining chitosan with Bi_2S_3 semiconductor QDs were designed and synthesized via a single-step "green" aqueous colloidal process at room temperature. The results demonstrated that chitosan was an effective polymer ligand for nucleating and stabilizing ultra-small Bi_2S_3 QDs, forming colloidal core-shell nanostructures in aqueous dispersions. In addition, it was verified that variation of pH and molar ratio of precursors during the synthesis affected the physico-chemical properties and morphological aspects of the nanostructures. Moreover, these water-soluble nanoconjugates were photoluminescent under light irradiation and biocompatible toward SAOS cell culture, which can be potentially used as narrow-bandgap fluorophores in biomedical and pharmaceutical applications using an environmentally friendly process.

Methods

Materials

All of the reagents and precursors, including bismuth chloride (Aldrich, USA, $\geq 98\%$, BiCl_3), sodium sulfide (Synth, Brazil, $> 98\%$, $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), sodium hydroxide (Merck, USA, $\geq 99\%$, NaOH), and acetic acid (Synth, Brazil, $\geq 99.7\%$, CH_3COOH) were used as received. Chitosan (Aldrich Chemical, USA, catalogue # 419419; high molecular weight, $M_w = 310$ to > 395 kDa; degree of deacetylation $\text{DD} \geq 75.0\%$; viscosity 800–2000 cP, 1 wt% in 1 % acetic acid) was used as the reference polysaccharide ligand. Unless otherwise indicated, deionized water (DI water, Millipore Simplicity™) with a resistivity of 18 $\text{M}\Omega$ cm was used to prepare the solutions, and the procedures were conducted at room temperature (RT, 23 ± 2 °C).

Methods

Synthesis of Bi_2S_3 /Chitosan Nanoconjugates

Bi_2S_3 nanoparticles were synthesized via an aqueous colloidal route in a reaction flask at room temperature. Precursors with three different molar ratios, $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}]$, were evaluated: 0.33 (excess of sulfur), 0.67 (stoichiometric), and 1.33 (excess of bismuth). The synthesis of the Bi_2S_3 nanoparticles was carried out as follows: 2 mL of chitosan (CHI) solution (1 % w/v in 2 % v/v aqueous solution of acetic acid) and 45 mL of DI water were added to the flask reaction vessel. Under moderate magnetic stirring, X mL ($X = 6$ mL for 0.33; $X = 3$ mL for 0.67 and 1.33) of S^{2-} precursor solution ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 1.0×10^{-2} mol L^{-1}) and Y mL ($Y = 2$ mL for 0.33 and 0.67; $Y = 4$ mL for 1.33)

of Bi^{3+} precursor solution (BiCl_3 , 1.0×10^{-2} mol L^{-1} in acetic acid) were added to the flask and stirred for 60 min. During the addition of Bi^{3+} solution, the pH was measured and adjusted to 2.5 ± 0.1 or 3.5 ± 0.1 with NaOH (1.0 mol L^{-1}). The Bi_2S_3 QDs suspensions produced were referred to as QD_CHI $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}]_{\text{pH}}$, where $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}]$ was 0.33, 0.67, or 1.33 and the pH was 2.5 or 3.5, as a function of the molar ratio of precursors and the pH of quantum dots synthesis.

Characterization of Bi_2S_3 /Chitosan Nanoconjugates

UV-visible (UV-vis) spectroscopy measurements were conducted using Perkin-Elmer equipment (Lambda EZ-210) in transmission mode with a quartz cuvette. Measurements were taken over a wavelength range of 1100 to 190 nm.

The morphological and structural features of the quantum dots were characterized using transmission electron microscopy (TEM, Tecnai G2-20-FEI microscope, 200 kV) coupled to an energy dispersive X-ray (EDX) microprobe and using selected area electron diffraction (SAED) analysis. QD sizes and distribution data were obtained based on the TEM images by measuring at least 100 randomly selected nanoparticles using an image processing freeware program (ImageJ, version 1.49, public domain, National Institutes of Health).

X-ray photoelectron spectra (XPS) analysis was performed on an Amicus spectrometer (Shimadzu, Japan) using $\text{Mg-K}\alpha$ as the excitation source. All peaks positions were corrected based on C 1s binding energy (284.6 eV).

Dynamic light scattering (DLS) and zeta potential (ZP) measurements were performed in the QD colloidal dispersions using a ZetaPlus instrument with the laser light diffusion method (Brookhaven Instruments).

Photoluminescence (PL) characterization of the nano-hybrids was conducted based on spectra acquired at room temperature using a violet diode laser module at $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm (150 mW, Roithner LaserTechnik, GmbH) coupled to a USB4000 VIS-NIR spectrophotometer (Ocean Optics).

In addition, the QD colloidal solutions were placed inside a "darkroom-chamber" where they were illuminated by a UV radiation emission bulb ($\lambda_{\text{excitation}} = 365$ nm, 6-W, Boitton Instruments). Digital color images were collected of the fluorescence of the QDs in the visible range of the light spectrum. Quantum yield (QY) was measured according to established procedure by using Rhodamine 6G (Sigma, USA) in ethanol as the standard at $\lambda_{\text{excitation}} = 405$ nm [24].

Cytotoxicity Assay by MTT

Culture of Human Sarcoma Cell Line Culture (SAOS) The immortalized human osteosarcoma-derived (SAOS)

cells were provided by Prof. A. Goes of the Department of Immunology and Biochemistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). SAOS cells are broadly accepted as a model cell line for the preliminary assessment of biocompatibility of materials and devices. The SAOS cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) with 10 % fetal bovine serum (FBS), streptomycin sulfate (10 mg mL^{-1}), penicillin G sodium (10 units mL^{-1}), and amphotericin-b (0.025 mg mL^{-1}), all of them were supplied by Gibco BRL (NY, USA), using a humidified atmosphere of 5 % CO_2 at 37 °C. The cells were used for experiments on passage 23.

All of the biological tests were performed according to ISO standards 10993-5:1999 (Biological evaluation of medical devices; part 5: tests for in vitro cytotoxicity). All experiments were performed using the direct contact methodology.

Method SAOS cells were plated (3×10^5 cells/well) in 96-well plates. Cell populations were synchronized in serum-free media for 24 h. After this period, the media volume was suctioned and replaced with media containing 10 % FBS for 24 h. The samples of Bi_2S_3 /polymer nanoconjugates were added to individual wells at a concentration of 3.0 %. Controls had been used with cells and DMEM medium with 10 % FBS, positive control Triton X-100 (1 %) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and as negative control chips sterile polypropylene Eppendorf (1 mg mL^{-1} , Eppendorf, Hamburg, Germany). After 24 h, all media was aspirated and replaced with 60 μL culture medium with serum to each well and photographed using an inverted optical microscope (Leica DMIL LED, Germany). MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5 mg mL^{-1} , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to each well and incubated for 4 h in an oven at 37 °C and 5 % CO_2 . After, they were placed on a 40- μL SDS solution/4 % HCl, with incubation for 16 h in an oven at 37 °C and 5 % CO_2 . Then, 100 μL were removed from each well and transferred to a 96-well plate, and quantifying of the absorbance was taken into a Thermo Plate (TP-READER) with a 595-nm filter. The values obtained were expressed as percentage of viable cells according to Eq. 1. It is attributed that the values of controls (wells with cells, and no samples) has 100 % cell viability.

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Abs of sample and cells}}{\text{Abs of control}} \times 100\% \quad (1)$$

Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for data analysis. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by Bonferroni

method, with $p < 0.05$ considered statistically significant. The experiments were performed in triplicate ($n = 3$).

Cellular Uptake of Bi_2S_3 Quantum Dot/Chitosan Nanoconjugates

Kidney Cell Line of a Human Embryo Culture (HEK293T Cells) The human embryonic kidney cell line (HEK293T) was kindly provided by Prof. M.F. Leite of the Department of Physiology and Biophysics, UFMG. The cells were cultured in DMEM with 10 % FBS, penicillin G sodium (10 units mL^{-1}), streptomycin sulfate (10 mg mL^{-1}), and amphotericin-b (0.025 mg mL^{-1}), in a humidified atmosphere of 5 % CO_2 at 37°C . The HEK293T cells were used for the experiments on passage 7.

Confocal Laser Scanning Microscopy The HEK293T cells were plated (5×10^4 cells/well) in 24-well plates. The cells were incubated for 4 days in 5 % CO_2 at 37°C and synchronized for 24 h. The QD_CHI0.67_2.5 sample containing 50 % of the medium solution was added to the HEK293T cells. Next, the cells were incubated in 5 % CO_2 at 37°C for 1 h and washed with phosphate-buffered saline (PBS, Gibco BRL, NY, USA). After washing, the cells were fixed with paraformaldehyde (4 %) for 30 min and washed three times with PBS, and cover slips were mounted with Hydromount (Fisher Scientific Ltd., Leicestershire, UK). Confocal laser scanning fluorescence microscopy (Zeiss LSM Meta 510, Carl Zeiss, Germany) was used to detect the fluorescence of the cells using a 488-nm argon laser irradiation to excite the QD–chitosan nanoconjugates. The emissions were collected in the range between 505 and 530 nm. For the control, HEK293T cells were incubated with only DMEM medium with 10 % FBS (immunofluorescence).

Results and Discussion

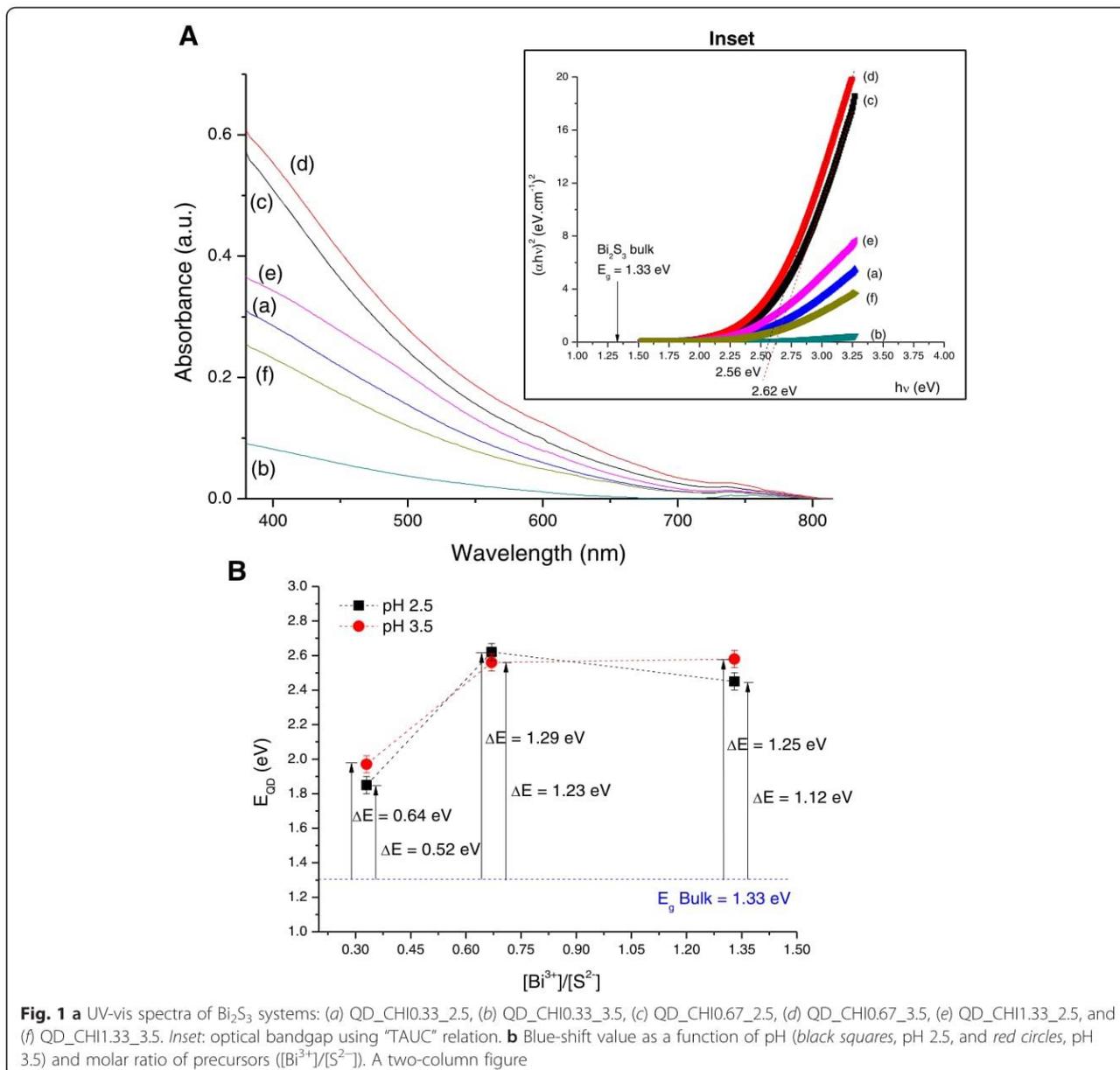
Physico-chemical Characterization of Chitosan/ Bi_2S_3 Nanoconjugates

Figure 1a shows the UV-vis absorption curves of the Bi_2S_3 nanoparticles stabilized using chitosan as the capping ligand. An absorbance onset was observed at approximately $\lambda = 800 \text{ nm}$. In general, the UV-vis spectra did not present clearly defined excitonic peaks (i.e., broad excitonic transitions), which may be associated with the relative dispersity of QD size characteristic of aqueous colloidal processing routes compared to organometallic methods [1]. The bandgap energy (E_{QD}) of the synthesized nanoparticles was estimated using the linear form of TAUC relation for direct bandgap semiconductors (Eq. 2) [25] that relates the absorption coefficient (α) and the photon energy ($h\nu$) using a band form parameter (B).

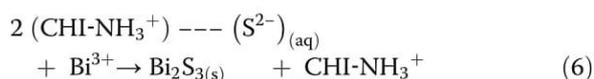
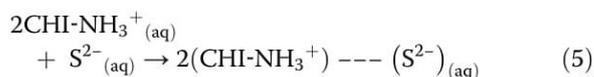
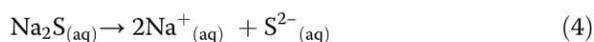
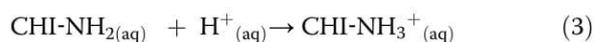
$$(h\nu)^2 = B(h\nu - E_{\text{QD}}) \quad (2)$$

The direct bandgap value of Bi_2S_3 QDs was calculated from the plots of $(\alpha h\nu)^2$ versus $h\nu$ extrapolating the straight portion of the graph (inset of Fig. 1a) to $\alpha h\nu = 0$. The obtained E_{QD} values (Fig. 1b) were higher than the corresponding bulk value (1.33 eV) for bismuth sulfite [26] as a consequence of the size quantization characteristics of the nanoparticles produced. The “blue-shift” ($\Delta E = E_{\text{QD}} - E_{\text{g}}$) determined for the QDs compared to the bulk value is presented in Fig. 1b.

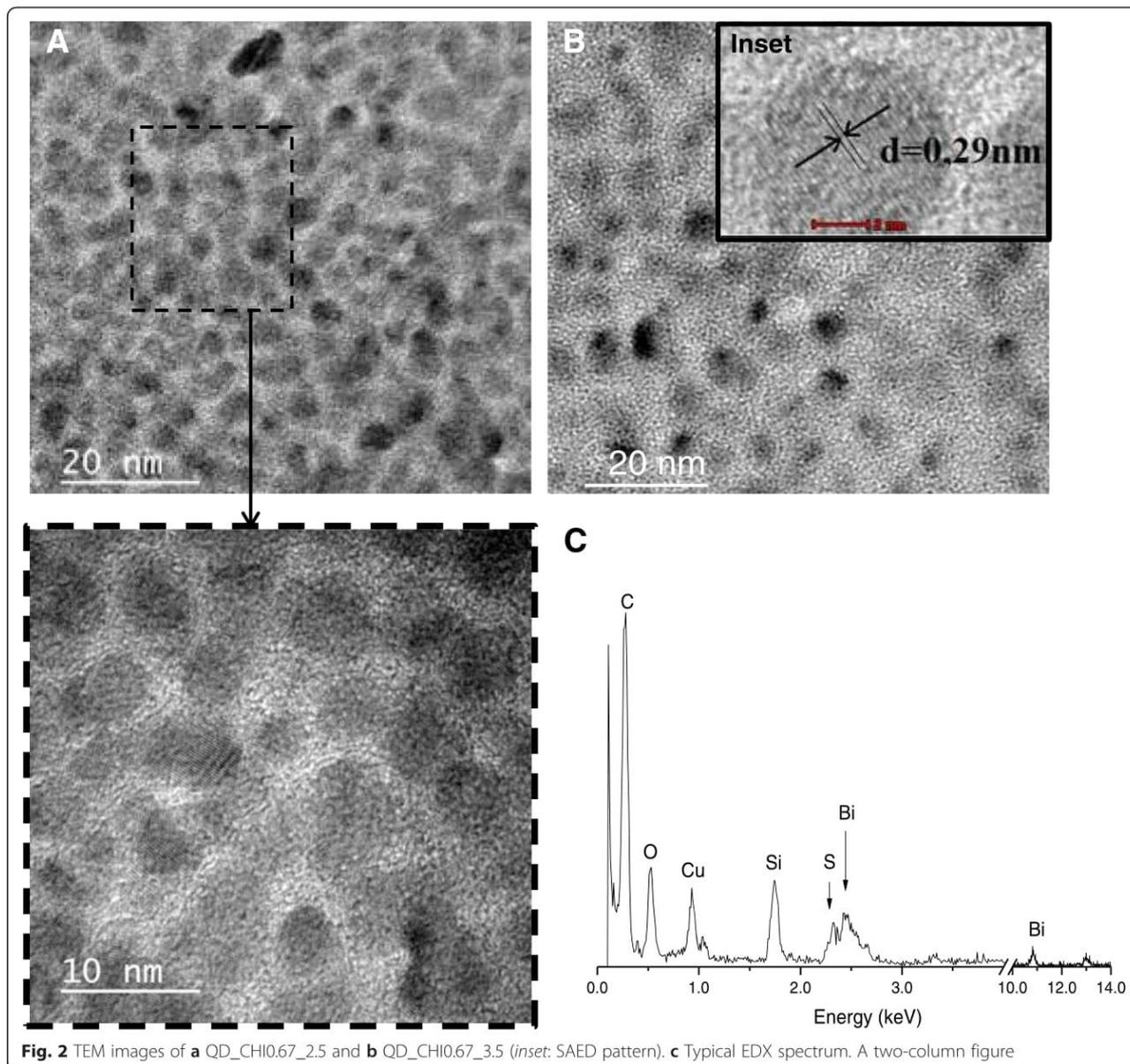
Typical TEM image obtained for the synthesized samples are shown in Fig. 2a, b, revealing that Bi_2S_3 QDs were spherical and homogeneously dispersed. It can be noted that the nanoparticle sizes were below Bohr’s radius ($a_{\text{B}} \sim 24 \text{ nm}$) for Bi_2S_3 [26], confirming that nanoparticles were in the “quantum confinement regime” and properly stabilized by chitosan as the polymer capping ligand. SAED patterns (inset of Fig. 2b) indicated a lattice parameter of $0.29 \pm 0.1 \text{ nm}$ compatible with the (221) plane of bismuthinite (JCPDS-43-1471). The EDX spectrum clearly indicated Bi and S chemical elements in addition to the peaks related to chitosan, the grid, and the detector (i.e., C, Si, O). The average Bi_2S_3 nanoparticle sizes prepared at pH 2.5 were evaluated using TEM images. Histograms of the diameter distribution for the samples with three molar ratios of $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}] = 0.33, 0.67, \text{ and } 1.33$ are shown in Fig. 3a–c, respectively. Based on the results, the molar ratio of the precursors considerably influenced the nanoparticle size of QDs with the highest content of bismuth ($[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}] = 1.33$, i.e., excess of Bi) leading to the formation of the smallest nanocrystal size. The same trend was observed for the syntheses performed at pH 3.5 (Fig. 3d). Therefore, differences in the pH did not considerably alter the Bi_2S_3 QD size. However, it is important to point out that the size of Bi_2S_3 nanoparticles for higher molar ratios (i.e., $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}] > 1.33$), which were not synthesized in this study cannot be directly predicted or extrapolated based on the results displayed in Fig. 3d of the three molar ratios of $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}]$ (0.33, 0.67, 1.33). Essentially, there are several complex thermodynamics and kinetics aspects involved in the colloidal system, regarding the nucleation/growth of these ultra-small nanocrystals in aqueous media using chitosan as a pH-dependent and multidentate polymeric ligand. It can be expected that the dimension of the Bi_2S_3 nanocrystals will not reduce much further at higher $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}]$ ratios, considering the relative depletion of $[\text{S}^{2-}]$ caused by the excess of $[\text{Bi}^{3+}]$ in the medium, decreasing the kinetics of the reaction. In addition, an exponential increase on the surface-area-to-volume ratio occurs by reducing the size of the nanoparticles therefore, disfavoring the thermodynamics for nucleation ($+\Delta G$).



The effect of the molar ratio ($[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}]$) on nanoparticle size may be explained as follows: at pH = 2.5 and 3.5, all of the amine groups of chitosan are protonated [27] and negatively charged sulfides (S^{2-}) interact with $-\text{NH}_3^+$ groups as represented in Eqs. 3–5. When Bi^{3+} ions were added to the reacting vessel, they acted as nucleation sites for Bi_2S_3 particle formations (Eq. 6). The excess of bismuth at a molar ratio of $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}] = 1.33$ favored the stabilization of the Bi_2S_3 nanocrystals at smaller dimensions due to the increase in the number of nucleation sites ("seeds"). In parallel, the lower ratio of $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}]$ produced relatively larger Bi_2S_3 QDs, as the S^{2-} species in solution were stabilized by the protonated amine groups in the chitosan chain reducing the nucleation kinetics.



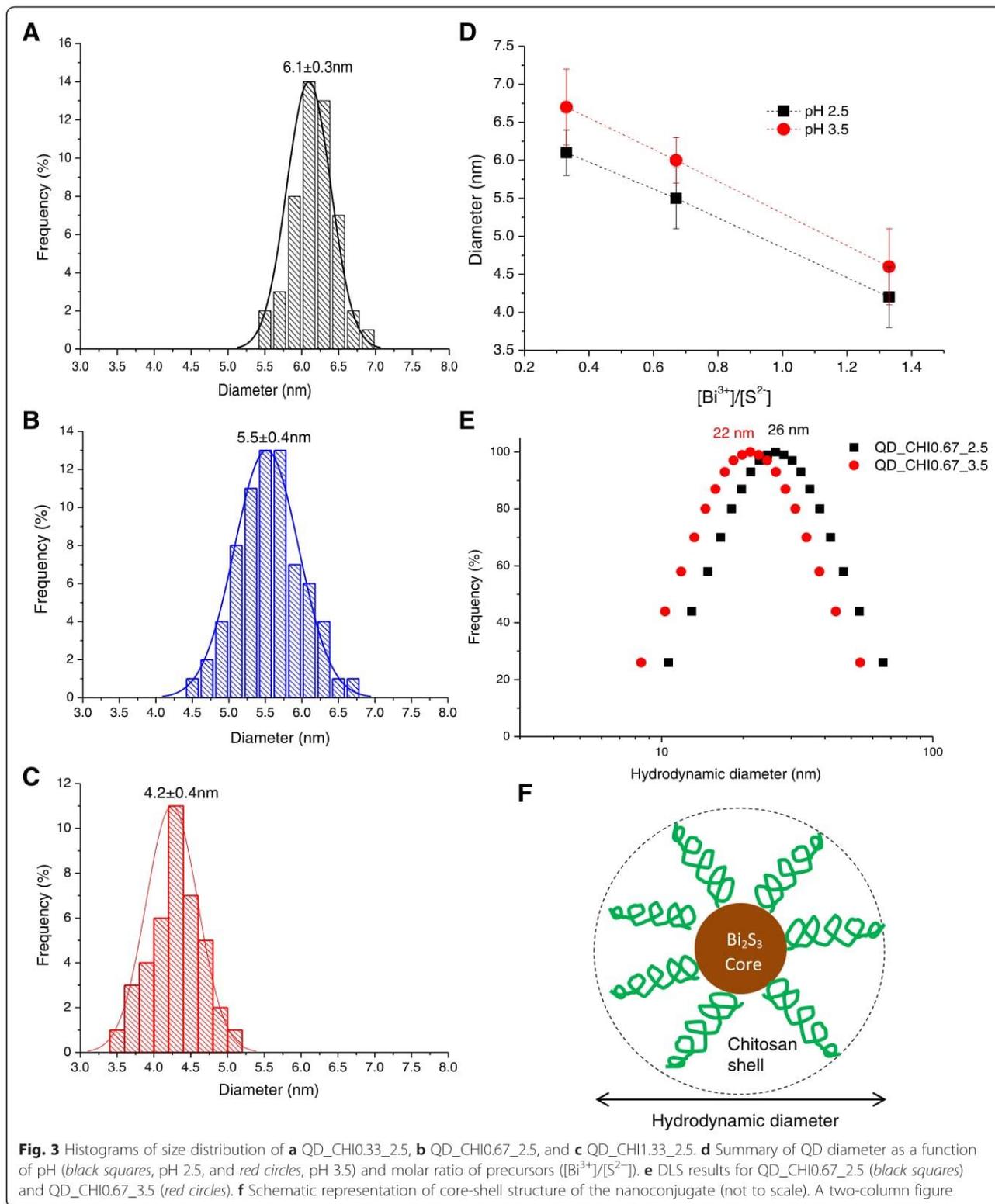
DLS results (Fig. 3e) revealed that the hydrodynamic diameter (H_D) of the core-shell (Bi_2S_3 -chitosan) nanoconjugates were approximately 22 and 26 nm for the systems QD_CHI0.67_2.5 and QD_CHI0.67_3.5, respectively.



These values are associated with the interactions between chitosan and aqueous medium (Fig. 3f). As expected, the H_D values are higher than the sizes evaluated by TEM technique, which were only related to dimension of the inorganic core of Bi_2S_3 nanocrystals.

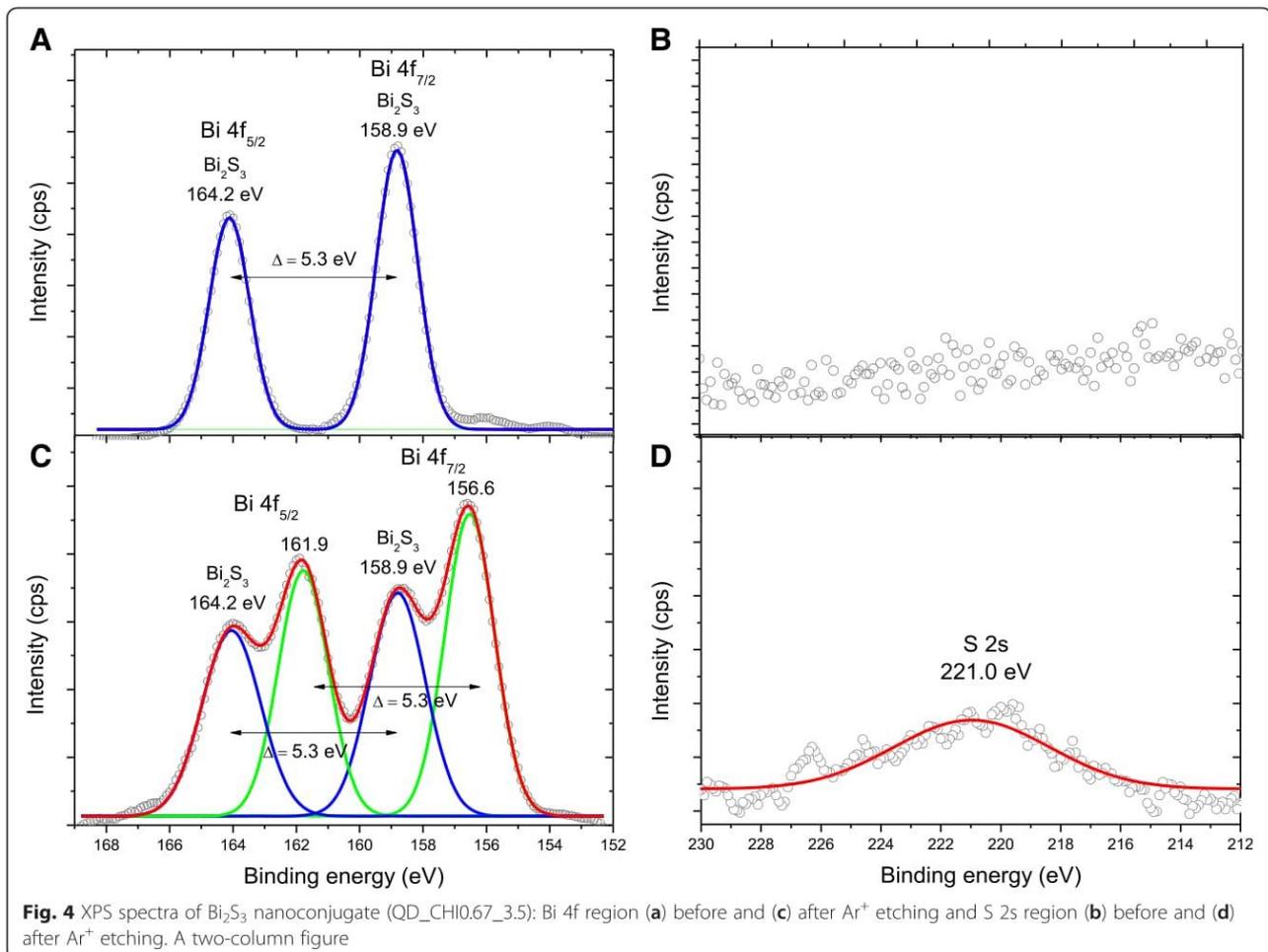
To perform a more in-depth characterization of the Bi_2S_3 QDs at the nanoscale order and to identify the chemical states of the elements at the surfaces, the nanoconjugates were evaluated by XPS. Figure 4a shows typical XPS spectra obtained directly at the surface of the Bi_2S_3 /chitosan nanoconjugate. The peaks at 158.9 and 164.2 eV correspond to the $\text{Bi } 4f_{7/2}$ and $\text{Bi } 4f_{5/2}$ levels, respectively, which are generally assigned to Bi–S bonding in Bi_2S_3 [28, 29]. After etching (Fig. 4c, Ar^+ ,

1 cycle, 60 s, emission current 10 mA, and beam voltage 0.5 kV), the $\text{Bi } 4f_{7/2}$ consisted of two binding energies of 156.6 and 158.9 eV, whereas the binding energies values for $\text{Bi } 4f_{5/2}$ were centered at 161.9 and 164.2 eV. The peaks at 156.6 and 161.9 eV were assigned to bismuth under-coordinated and reduced species due to the etching by argon ion beam [28, 29]. The peaks at 158.9 and 164.2 eV indicate the presence of Bi^{3+} in the Bi_2S_3 phase, as already observed at the surface prior to etching. In addition, the XPS spectra at the QD surface in the S 2s region (Fig. 4b) indicated no detectable signal from sulfur. However, after etching, the surface showed a broad peak approximately at 221.0 eV, which can be assigned to the binding energy of S^{2-} state in Bi_2S_3 [30]. This



result indicated that Bi-rich surfaces of Bi_2S_3 quantum dots were produced, which is consistent with metal-chalcogenide nanocrystals synthesized in the presence of coordinating ligands bound covalently to cations [7].

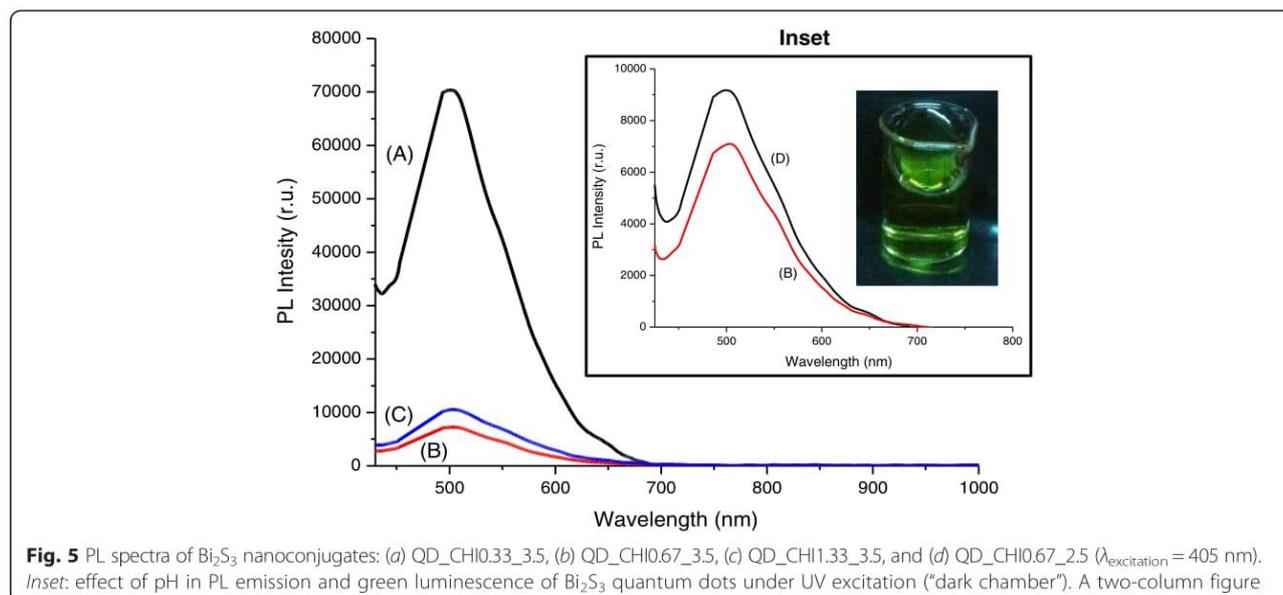
Zeta potential (ζ) measurements for QD_CHI0.67_2.5 and QD_CHI0.67_3.5 were $\zeta = +56 \pm 1$ mV and $\zeta = +37 \pm 3$ mV, respectively. Under the highly acidic conditions of both pH values investigated, all amine groups of



chitosan are protonated, but at pH 2.5, there are more H^+ ions in solution repelling and exposing more $-\text{NH}_3^+$ groups at the nanohybrid surface (i.e., the outermost surface of the organic shell). At pH 3.5, the molar ratio of the precursors also influenced the ZP values. At a molar ratio $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}] = 0.33$, ZP was measured to be $\zeta = +31 \pm 3$ mV, which is lower than the value obtained for the stoichiometric system where $[\text{Bi}^{3+}]/[\text{S}^{2-}] = 0.67$ (i.e., Bi_2S_3 , ratio $2/3 = 0.67$). This difference may be due to the excess S^{2-} ions forming complexes with protonated amines reducing the positive charge at the double layer. For the system QD_CHI1.33_3.5, ZP was $\zeta = +33 \pm 11$ mV. The relatively higher statistical standard deviation may be attributed to the excess of Bi^{3+} species that increases the repulsion between the $-\text{NH}_3^+$ groups in the chitosan chains, thus disrupting the balanced core-shell nanostructure. In addition, ZP results indicated that the QDs were mostly electrostatically stabilized ($\zeta > +30$ mV), preventing close contact between nanoparticles, compatible with the homogeneously dispersed features of nanoparticles observed in TEM

images. As a general trend, irrespective to the molar ratio of Bi:S used in the synthesis, all nanoconjugates presented positive ζ -potential values, which was attributed to the protonation of amine groups of the chitosan polymeric shell under the acidic conditions at pH = 2.5 and pH = 3.5. Clearly, it is worth mentioning that, as far as the potential applications of these nanoconjugates in biomedical and environmental fields are concerned, these colloidal systems need to be previously buffered to raise the pH of the media to the range of 6.0 to 8.0, to render them biocompatible.

All of the systems presented luminescent behavior under excitation, with the predominant PL emission band appearing in the spectral range of 450 to 650 nm (green-orange) (Fig. 5 and inset). The results of photoluminescence of Bi_2S_3 nanoconjugates indicated that the excitonic emission is not predominant, because the maxima wavelengths of the PL spectra were statistically similar ($\lambda_{\text{PL}} = 504 \pm 1$ nm) despite the different absorptions in UV-vis spectroscopy. Thus, the emission is the overall contribution of radiative recombination from QDs and/

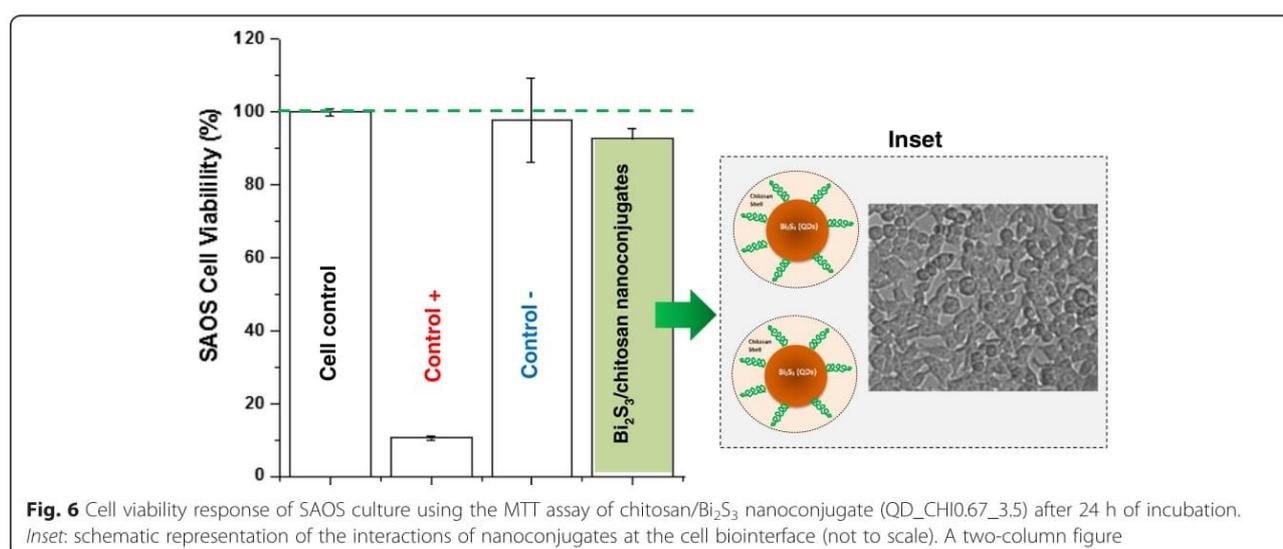


or electronic transitions from Bi^{3+} , usually the backward radiative transition $^3\text{P}_1 \rightarrow ^1\text{S}_0$ [31]. Based on Fig. 5, the luminescence intensity was reasonably dependent on the molar ratio of precursors: the highest luminescence response was measured for the 0.33 ratio, which is associated with the biggest nanocrystal size. This behavior is usually observed due to the density of surface defects (e.g., energy trap stages) and increase in the non-radiative pathways as the quantum dot size decreases [1, 32]. In addition, the QY of the Bi_2S_3 nanoconjugates was estimated to be approximately 1.0 %, in good agreement with the reports published of QDs synthesized using aqueous colloidal routes at low temperatures,

which is usually smaller than of QDs prepared at high temperature in organic process [1].

Cytotoxicity Assay by MTT of Chitosan/ Bi_2S_3 Nanoconjugates

The biocompatibility of Bi_2S_3 nanomaterials has been reported in the literature [33–35]. In this study, the assessment of the cytotoxicity of core-shell Bi_2S_3 /chitosan nanoconjugates was performed using the enzymatic-based MTT assay, with samples synthesized at $\text{pH} = 3.5$, (QD_CHI0.67_3.5) using SAOS cell line. This method is considered superior to other similar methods



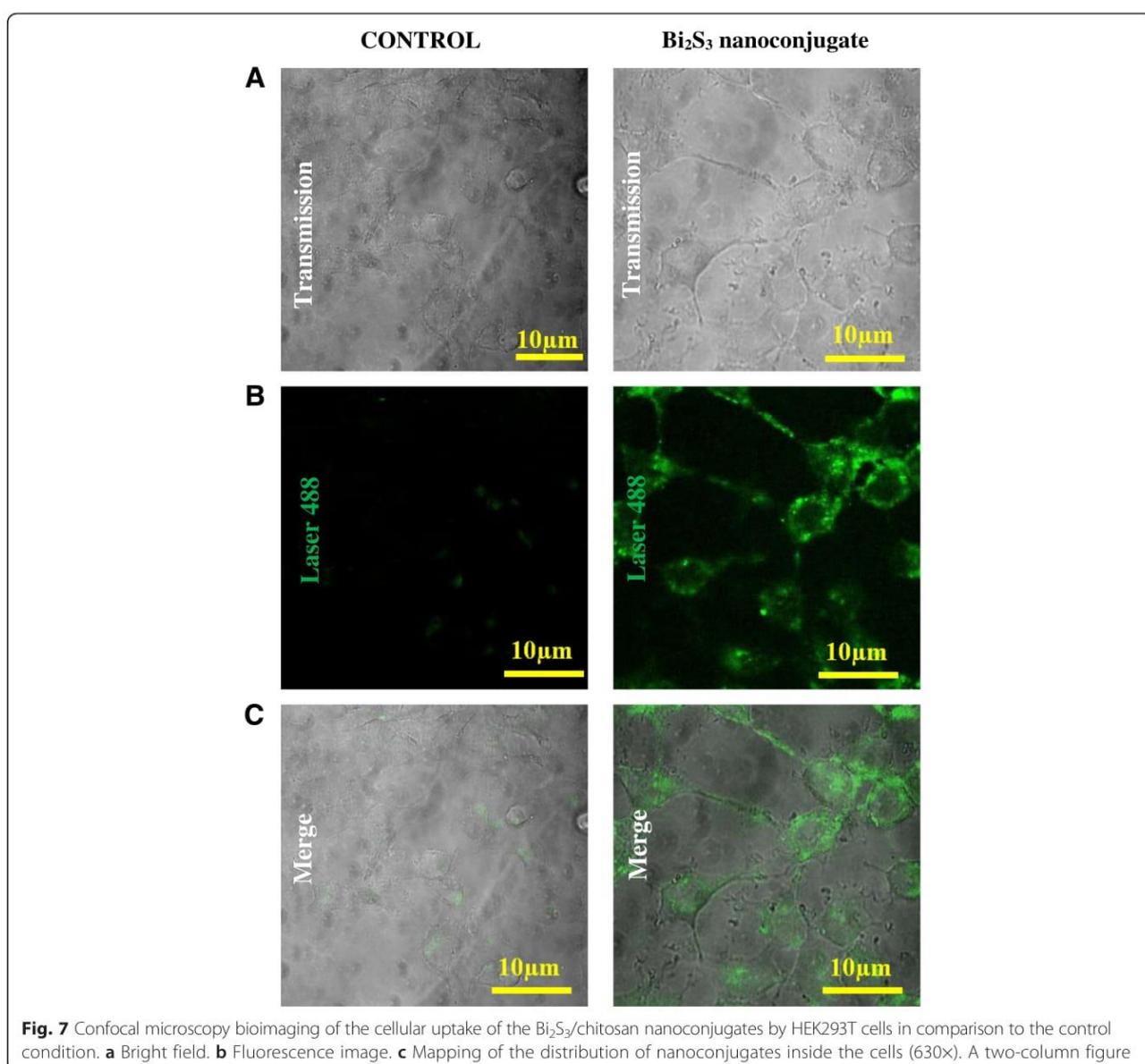
because it is safe, easy to use, has a high reproducibility, and is broadly performed for both cell viability and cytotoxicity tests.

Thus, the results of SAOS cells in contact with the Bi_2S_3 /chitosan nanoconjugate samples evidenced no difference in the cell viability and non-toxic effect compared to the control group, within the statistical range of variation (Fig. 6). The nanoconjugates showed cell viability response of over 90 % (i.e., non-cytotoxic), which can be essentially assigned to the approach used in this research. That means, these nanoconjugates were designed and produced with a “cadmium-free” nanocore (Bi_2S_3) and surface functionalized with the chitosan polysaccharide shell aiming at rendering them

biocompatible and, therefore, theoretically safer for biological applications. The schematic representation of interactions of the nanoconjugates with the SAOS cell membranes is depicted in Fig. 6 (inset). Moreover, these novel biocompatible and water-soluble nanoconjugates were developed using a facile eco-friendly aqueous processing route.

Cell Uptake of Bi_2S_3 /Chitosan Nanoconjugates Biomarkers

Endocytosis is the biological process responsible for the internalization of nanoparticles by cells. This process depends on energy and functional coordination of lipids and plasma membrane. Therefore, studies that allow



the visualization of internalization of nanomaterials are important tools for the development and biological characterization of nanoparticles [36, 37]. Thus, in this study, confocal fluorescence microscopy was used to determine the cell uptake of the Bi₂S₃ nanoconjugates in HEK293T cells. Figure 7 shows fluorescent images of QD_CHI0.67_3.5 internalization in comparison with the control sample (autofluorescence). These results demonstrated the biocompatibility and bioimaging properties of the novel Bi₂S₃ QD–chitosan nanoconjugates. They can be used for intracellular targeting as biomarker or for drug-delivery because these nanoconjugates presented efficient translocation across the cell plasma membrane [38].

Conclusions

In summary, nanoconjugates were designed and synthesized with chitosan as the biopolymer shell and Bi₂S₃ semiconductor quantum dot as the fluorescent inorganic core. These nano hybrids were produced using a single-step eco-friendly aqueous colloidal processing route at room temperature. The results demonstrated that chitosan behaved as an effective ligand for nucleating and stabilizing ultra-small Bi₂S₃ QDs, leading to the formation of colloidal core-shell nanostructures in aqueous dispersions. These nanoconjugates were cytocompatible evaluated by the MTT assay and exhibited photoluminescence under light excitation. Furthermore, the results of cell studies show that the QD–chitosan conjugates display good HEK293T cell uptake in the absence of non-specific binding to the cell membrane and, therefore, they can be potentially used as fluorescent nanosized bioprobes to label cells *in vitro* for cell bioimaging applications.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

HSM carried out the experimental design and analysis and drafted the manuscript. AAPM carried out the characterization and analysis and drafted the manuscript. FPR participated in the synthesis, characterization, and analysis of quantum dots. SMC and MCF designed, performed, and analyzed the biological assays of nanoconjugates regarding cytotoxicity and cellular bioimaging. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the following Brazilian research agencies: CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROEX-433/2010;PNPD), FAPEMIG—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (PPM-00202-13;BCN-TEC 30030/12), CNPq—Conselho Nacional de Pesquisa (PQ1B-306306/2014-0; UNIVERSAL-457537/2014-0), and FINEP—Financiadora de Estudos e Projetos (CTINFRA-PROINFRA 2008/2010). The authors also express their gratitude to the staff of the Microscopy Center, UFMG, for their assistance on the TEM analysis.

Author details

¹Center of Nanoscience, Nanotechnology and Innovation - CeNano², Department of Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627-Escola de Engenharia, Bloco 2-Sala 2233, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil. ²Department of

Preventive Veterinary Medicine, UFMG, Belo Horizonte, Brazil. ³Department of Physiology and Biophysics, UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

Received: 7 February 2016 Accepted: 4 April 2016

Published online: 12 April 2016

References

- Mansur HS (2010) Quantum dots and nanocomposites. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2:113–129. doi:10.1002/wnan.78
- Chaudhuri RG, Paria S (2012) Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chem Rev* 112: 2373–2433. doi:10.1021/cr100449n
- Hezinger AF, Tessmar J, Gopferich A (2008) Polymer coating of quantum dots—a powerful tool toward diagnostics and sensorics. *Eur J Pharm Biopharm* 68:138–152. doi:10.1016/j.ejpb.2007.05.013
- Mansur A, Mansur H, González J (2011) Enzyme-polymers conjugated to quantum-dots for sensing applications. *Sensors* 11:9951–9972. doi:10.3390/s111009951
- Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. *Nat Mater* 4:435–446. doi:10.1038/nmat1390
- Yin Y, Alivisatos AP (2005) Colloidal nanocrystal synthesis and the organic–inorganic interface. *Nature* 437:664–670. doi:10.1038/nature04165
- Aresti M, Saba M, Piras R, Marongiu D, Mula G, Quochi F, Mura A, Cannas C, Mureddu M, Ardu A, Ennas G, Calzia V, Mattoni A, Musinu A, Bongiovanni G (2014) Colloidal Bi₂S₃ nanocrystals: quantum size effects and midgap states. *Adv Funct Mater* 24:3341–3350. doi:10.1002/adfm.201303879
- Kershaw SV, Susha AS, Rogach AL (2013) Narrow bandgap colloidal metal chalcogenide quantum dots: synthetic methods, heterostructures, assemblies, electronic and infrared optical properties. *Chem Soc Rev* 42: 3033–3087. doi:10.1039/C2CS35331H
- Luo Y, Chen H, Li X, Gong Z, Wang X, Peng X, He M, Sheng Z (2013) Wet chemical synthesis of Bi₂S₃ nanorods for efficient photocatalysis. *Mater Lett* 105:12–15. doi:10.1016/j.matlet.2013.04.006
- Green M (2010) The nature of quantum dot capping ligands. *J Mater Chem* 20:5797–5809. doi:10.1039/C0JM00007H
- Efros AL (1982) Interband absorption of light in a semiconductor. *Sphere Sov Phys Semicond* 16:772–775
- Ekimov AI, Onushchenko AA (1982) Quantum size effect in the optical-spectra of semiconductor micro-crystals. *Sov Phys Semicond* 16:775–778
- Mansur HS, Grieser F, Urquhart RS, Furlong DN (1995) Photoelectrochemical behaviour of Q-state CdS_xSe_{1-x} particles in arachidic acid LB films. *J Chem Soc Faraday Trans* 91:3399–3404. doi:10.1039/FT9959103399
- Tan WB, Huang N, Zhang Y (2007) Ultrafine biocompatible chitosan nanoparticles encapsulating multi-coloured quantum dots for bioapplications. *J Colloid Interface Sci* 310:464–470. doi:10.1016/j.jcis.2007.01.083
- Drbohlavova J, Adam V, Kizek R, Hubalek J (2009) Quantum dots—characterization, preparation and usage in biological systems. *Int J Mol Sci* 10:656–673. doi:10.3390/ijms10020656
- Henglein A (1982) Photo-degradation and fluorescence of colloidal-cadmium sulfide in aqueous solution. *Ber Bunsen-Ges Phys Chem* 86:301–305. doi:10.1002/bbpc.19820860409
- Mansur AAP, Mansur HS, Ramanery FP, Oliveira LC, Souza PP (2014) “Green” colloidal ZnS quantum dots/chitosan nano-photocatalysts for advanced oxidation processes: study of the photodegradation of organic dye pollutants. *Appl Catal B* 158–159:269–279. doi:10.1016/j.apcatb.2014.04.026
- Murray CB, Norris DJ, Bawendi MG (1993) Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S and Se and Te) semiconductor nanocrystallites. *J Am Chem Soc* 115:8706–8715. doi:10.1021/ja00072a025
- Lesnyak V, Gaponik N, Eychmüller A (2013) Colloidal semiconductor nanocrystals: the aqueous approach. *Chem Soc Rev* 42:2905–2929. doi:10.1039/C2CS35285K
- Mansur AAP, Carvalho SM, Mansur HS (2016) Bioengineered quantum dot/chitosan-tripeptide nanoconjugates for targeting the receptors of cancer cells. *Int J Biol Macromol* 82:780–789. doi:10.1016/j.jbiomac.2015.10.047
- Mansur HS, Mansur AAP, Soriano-Araujo A, Lobato ZIP (2015) Beyond biocompatibility: an approach for the synthesis of ZnS quantum dot-chitosan nano-immunoconjugates for cancer diagnosis. *Green Chem* 17: 1820–1830. doi:10.1039/C4GC02072C

22. Mansur HS, Mansur AAP, Curti E, Almeida MV (2012) Bioconjugation of quantum-dots with chitosan and *N,N,N*-trimethyl chitosan. *Carbohydr Polym* 90:189–196. doi:10.1016/j.carbpol.2012.05.022
23. Liao HC, Wu MC, Jao MH, Chuang CM, Chen YF, Su WF (2012) Synthesis, optical and photovoltaic properties of bismuth sulfide nanorods. *Cryst Eng Comm* 14:3645–3652. doi:10.1039/C2CE06154F
24. Eaton DF (1988) Reference materials for fluorescence. *Pure Appl Chem* 60: 1107–1114. doi:10.1351/pac198860071107
25. Tauc J, Mentha A (1972) States in the gap. *J Non Cryst Solids* 8–10:569–585. doi:10.1016/0022-3093(72)90194-9
26. Cheng H, Huang B, Qin X, Zhang X, Dai Y (2012) A controlled anion exchange strategy to synthesize Bi₂S₃ nanocrystals/BiOCl hybrid architectures with efficient visible light photoactivity. *Chem Commun* 48: 97–99. doi:10.1039/C1CC15487G
27. Ramanery FP, Mansur AAP, Mansur HS (2013) One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates. *Nanoscale Res Lett* 8:512. doi:10.1186/1556-276X-8-512
28. Zhang J, Liu S, Yu J, Jaroniec M (2011) A simple cation exchange approach to Bi-doped ZnS hollow spheres with enhanced UV and visible-light photocatalytic H₂-production activity. *J Mater Chem* 21:14655–14662. doi:10.1039/C1JM12596
29. Ginting RT, Lee HB, Tan ST, Tan CH, Jumali MHH, Yap CC, Kang JW, Yahaya M (2016) A simple approach low-temperature solution process for preparation of bismuth-doped ZnO nanorods and its application in hybrid solar cells. *J Phys Chem C* 120:771–780. doi:10.1021/acs.jpcc.5b11094
30. Panigrahi PK, Pathak A (2013) The growth of bismuth sulfide nanorods from spherical-shaped amorphous precursor particles under hydrothermal condition. *J Nanopart* 2013:367812. doi:10.1155/2013/367812
31. Gao G, Peng M, Wondraczek L (2014) Spectral shifting and NIR down-conversion in Bi³⁺/Yb³⁺ co-doped Zn₂GeO₄. *J Mater Chem C* 2:8083–8088. doi:10.1039/C4TC01242A
32. Dabbousi BO, Rodriguez-Viejo J, Mikulec FV, Heine JR, Mattoussi H, Ober R, Jensen KF, Bawendi MG (1997) (CdSe)ZnS core–shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J Phys Chem B* 101:9463–9475. doi:10.1021/jp971091y
33. Mohan R (2010) Green bismuth. *Nat Chem* 2:336. doi:10.1038/nchem.609
34. Fang Y, Peng C, Guo R, Zheng L, Qin J, Zhou B, Shen M, Lu X, Zhang G, Shi X (2013) Dendrimer-stabilized bismuth sulfide nanoparticles: synthesis, characterization, and potential computed tomography imaging applications. *Analyst* 138:3172–3180. doi:10.1039/c3an00237c
35. Rabin O, Perez JM, Grimm J, Wojtkiewicz G, Weissleder R (2006) An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. *Nat Mater* 5:118–122. doi:10.1038/nmat1571
36. Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU (2012) Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS Nano* 6:1251–1259. doi:10.1021/nn203892h
37. Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C, Zhao Y (2011) Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small* 7:1322–1337. doi:10.1002/sml.201100001
38. Yameen B, Choi WI, Vilos C, Swami A, Shi J, Farokhzad OC (2014) Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Control Release* 190:485–499. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.038

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

RESEARCH ARTICLE

Angiotensin Converting Enzyme Regulates Cell Proliferation and Migration

Erika Costa de Alvarenga^{1,2}✉, Matheus de Castro Fonseca¹✉, Clarissa Coelho Carvalho¹, Rodrigo Machado Florentino¹, Andressa França¹, Eveline Matias³, Paola Bianchi Guimarães⁴, Carolina Batista⁴, Valder Freire³, Adriana Karaoglanovic Carmona⁴, João Bosco Pesquero⁴, Ana Maria de Paula⁵, Giselle Foureaux^{1,6}, Maria de Fatima Leite¹*

1 Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2 Department of Natural Sciences, Federal University of São João del Rei, São João Del Rey, MG, Brazil, 3 Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, 4 Department of Biophysics, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, 5 Department of Physics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, 6 Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* leitemd@ufmg.br



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Alvarenga ECd, Fonseca MdC, Carvalho CC, Florentino RM, França A, Matias E, et al. (2016) Angiotensin Converting Enzyme Regulates Cell Proliferation and Migration. PLoS ONE 11(12): e0165371. doi:10.1371/journal.pone.0165371

Editor: Stephanie Filleur, Texas Technical University Health Sciences Center, UNITED STATES

Received: May 20, 2016

Accepted: November 29, 2016

Published: December 19, 2016

Copyright: © 2016 Alvarenga et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and INCT Nanocarbono – UFMG (Brazil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

The angiotensin-I converting enzyme (ACE) plays a central role in the renin-angiotensin system, acting by converting the hormone angiotensin-I to the active peptide angiotensin-II (Ang-II). More recently, ACE was shown to act as a receptor for Ang-II, and its expression level was demonstrated to be higher in melanoma cells compared to their normal counterparts. However, the function that ACE plays as an Ang-II receptor in melanoma cells has not been defined yet.

Aim

Therefore, our aim was to examine the role of ACE in tumor cell proliferation and migration.

Results

We found that upon binding to ACE, Ang-II internalizes with a faster onset compared to the binding of Ang-II to its classical AT1 receptor. We also found that the complex Ang-II/ACE translocates to the nucleus, through a clathrin-mediated process, triggering a transient nuclear Ca^{2+} signal. *In silico* studies revealed a possible interaction site between ACE and phospholipase C (PLC), and experimental results in CHO cells, demonstrated that the $\beta 3$ isoform of PLC is the one involved in the Ca^{2+} signals induced by Ang-II/ACE interaction. Further studies in melanoma cells (TM-5) showed that Ang-II induced cell proliferation through ACE activation, an event that could be inhibited either by ACE inhibitor (Lisinopril) or by the silencing of ACE. In addition, we found that stimulation of ACE by Ang-II caused the melanoma cells to migrate, at least in part due to decreased vinculin expression, a focal adhesion structural protein.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusion

ACE activation regulates melanoma cell proliferation and migration.

Introduction

The renin-angiotensin system (RAS), a peptidergic hormone system, is well known for its role in the regulation of blood pressure, electrolyte balance and vascular remodeling [1, 2, 3]. Renin cleaves angiotensinogen to produce the decapeptide angiotensin (Ang) I. Subsequently, after cleavage of two carboxy-terminal amino acids by the angiotensin I-converting enzyme (ACE), Ang-I is converted into the octapeptide Ang-II. Two distinct forms of ACE are expressed in humans: a somatic form that is abundant on the surface of lung endothelial cells and a smaller isoenzyme found exclusively in testis [4]. The activity of somatic ACE has a crucial role in catalyzing the conversion of Ang-I to the Ang-II, which modulates blood pressure, vasoconstriction, inflammation, cell proliferation and vascular rearrangement [5].

In addition to the classic participation of ACE in the above-mentioned functions, new roles for ACE have recently been described [4, 6, 7]. The canonical Ang-II pathway is mediated by activation of either AT₁ or AT₂ receptors, which typically mediate opposite functions [8]. However, recent findings have revealed that, despite the traditional enzymatic functions, ACE is also capable of mediating intracellular signaling. Kohlstedt and colleagues [4] showed that binding of an ACE inhibitor to ACE elicits outside-in signaling in endothelial cells, enhancing the activity of ACE-associated kinase CK2 and increasing the phosphorylation of the intracellular tail of ACE. This in turn promotes the activation of JNK as well as the accumulation of phosphorylated c-Jun in the endothelial cell nucleus that ultimately increases ACE expression *in vitro* and *in vivo*. Such mechanism suggested that ACE activation might control expression of diverse proteins besides ACE itself. Indeed, Kohlstedt *et al.* [6] found that binding of ramipril (ACE inhibitor) to ACE directly induces a signaling cascade that results in the activation of the transcription factor AP-1 and an increase in the expression/activity of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. Furthermore, Guimarães *et al.* [7] demonstrated that ACE behaves as a receptor for Ang-II triggering Ca²⁺ signaling, through inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) formation. Accordingly, a binding site for Ang-II was described on ACE [9]. However, the role of Ang-II-mediated signaling through ACE is still unclear. In the current study, we investigated novel roles of ACE as Ang-II receptor, demonstrating that ACE regulates cell proliferation and migration in melanoma cells.

Materials and Methods

Material and Reagents

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI 1640 medium, penicillin, streptomycin, amphotericin and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco (Grand Island, USA). Fluo-4/AM, DAPI, secondary antibodies conjugated to Alexa-488, Alexa-633, Angiotensin-II FITC conjugate and Lipofectamine® 2000 were purchased from Life Technologies (New York, USA); rabbit IgG secondary antibody was purchased from Sigma-Aldrich, (St. Louis, USA). Polyclonal anti-GAPDH and anti-PLC antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Monoclonal anti-ACE antibody and mouse anti-Clathrin was obtained from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Anti-BrDU-POD kit was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Ambion Silencer kits were purchased from Life Technologies

(New York, USA). Hydromount was purchased from National Diagnostics (St. Louis, USA). Moloney murine leukemia virus was obtained from Invitrogen (California, USA), TaqMan Universal PCR Master Mix from Applied Biosystems (California, USA), enhanced chemiluminescence (ECL-plus Western Blotting Detection System) and peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Hydroxyurea was purchased from Sigma-Aldrich, (St. Louis, USA), enzyme linked immunosorbent assay from Roche Applied Science (Indianapolis, IN). Angiotensin II was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and Angiotensin-II FITC was purchased from Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA).

Cell Culture

Chinese Hamster Ovary (CHO, kindly supplied by Dr François Alhenc-Gelas from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France) cells were stably transfected with a plasmid containing the sequence of the human ACE (CHO-ACE), as previously reported [7]. Similarly, CHO-AT₁ cells were stably transfected with the plasmid pcDNA3, containing the sequence of the human AT₁. Also, we used Melan-a (murine melanocytes) and TM-5 cells (murine melanoma cells). Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, while melan-a and TM-5 were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Medium was changed every 3 or 4 days, and cells were subcultured, between days 6 and 8, by harvesting with trypsin-EDTA. Semi-confluent (80% to 90%) cells were used in all of the studies.

Preparation of siRNA

Potential target sites within the ACE gene were selected and then searched with NCBI Blast to confirm specificity for the protein. The siRNAs for ACE and scrambled sequence were prepared by a transcriptional-based method using the Ambion Silencer kit (Life Technologies, New York, USA), according to the manufacturer's instructions. The sense and antisense oligonucleotides of siRNA were, respectively: siRNA ACE 5' GCA GTA CAA CTC TCT GCT A 3' and 5' GCG GAT CAT AAA GAA GCT T 3'; siRNA scramble 5' GCG ATG AGT AGC ATC TCT A 3' and 5'GCA TGC GAC GAT GAC ATA A 3'. Validated siRNAs for clathrin heavy chain were obtained from Ambion (Life Technologies, New York, USA). The sense and antisense sequences were, respectively: siRNA cl 5' UAA UCC AAU UCG AAG ACC AAU 3' and 5' GUA UGA UGC UGC UAA ACU A 3'. Single wall carbon nanotubes (CNT) were used to deliver each siRNA as previously described [10, 11]. Cells were used 48 hours after siRNA treatment as indicated.

Western Blotting

CHO-ACE and TM-5 cells were harvested as described and protein content was quantified according to Bradford protein assay. For GAPDH detection, mouse monoclonal anti-GAPDH antibody was used at a dilution of 1:5000. For ACE detection, a mouse monoclonal antibody was used at dilution of 1:1000. For Clathrin detection, a rabbit monoclonal anti-Clathrin was used at a dilution of 1:1000. The antibody incubation proceeded for 2 hours at room temperature. After washing, blots were incubated with HRP conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody at a dilution of 1:5000 at room temperature for 1 hour. Immuno detection was carried out using enhanced chemiluminescence [12].

Immunofluorescence

Confocal immunofluorescence was performed as described [12]. Briefly, CHO-ACE cells were seeded onto 6 well culture dishes and 24 hours later, treated with 1 μ M Ang-II for the indicated times. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with PBS 1X/Triton 0.5% and blocked (PBS, BSA 10%, Triton 0.5%, goat serum 5%) for 1 hour. Cells were then incubated with anti-ACE (1:100), for 2 hours at room temperature. This was followed by incubation with DAPI and the specific secondary antibodies conjugated with Alexa-Fluor 488 or 633 (1:500) for 1 hour. Images were obtained using a Zeiss LSM 510 confocal microscope with 63X, 1.4 NA objective lens (Thornwood, USA) [10, 12].

Detection of calcium signals

Ca²⁺ signals were evaluated either by line-scanning or time-lapse confocal microscopy as described [13, 14]. Cells were incubated with 6 μ M Fluo-4/AM for 20 min at 37°C. Coverslips containing the cells were transferred to a custom-built perfusion chamber and were observed using a 63X, 1.4 NA objective lens under a Zeiss LSM 510 confocal microscope. Fluo-4/AM was excited at 488 nm using a krypton/argon laser. Global Ca²⁺ transients were measured in both the nucleus and the cytosol.

Internalization assay

Internalization kinetic assays were performed as described previously (modified from Thomas *et al.* [15]). Briefly, the transfected cells were exposed to 0.4 nM of ³H-AngII in a receptor-binding buffer for 3 hours at 4°C. Thereafter, cells were extensively washed with ice-cold receptor-binding buffer and placed at 37°C for 2, 5, 10, 20 and 40 min. Incubations were stopped by placing the cells on ice. Acid-released and acid-resistant radioactive were separated and measured [16]. The percentage of internalized ligand at each time point was calculated from the ratio of the acid-resistant specific binding to the total (acid-resistant + acid-released) specific binding.

Measurement of BrDU incorporation

Proliferation was measured by BrDU incorporation using an enzyme-linked immunosorbent assay (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), according to the manufacturer's instructions.

Migration assays

Migration experiments were performed as previously described [17, 18]. TM-5 cells were grown in 12-well plates and cultured in serum-free medium for 24 hours before the experiments. The wound was achieved by scratching a pipette tip across the cell monolayer (approximately 1.3 mm in width). Hydroxyurea (1 mM) was always included in the tissue culture media to prevent cell proliferation. Cells were stimulated with 1 μ M of Ang-II for the indicated times. The wound area was measured using the Northern Eclipse (Empix, Mississauga, Canada) software, and the percentage of wound closure at each time point was derived by the formula: $(1 - [\text{current wound size}/\text{initial wound size}]) \times 100$.

Quantitative RT-PCR analysis of ACE mRNA in TM-5 and melan-a cells

Total RNA (750 ng) was reverse transcribed to cDNA using Moloney murine leukemia virus (Invitrogen, California, USA) according to the manufacturer's instructions. The reaction product was amplified by real-time PCR on the 7000 Sequence Detection System (ABI Prism, Applied Biosystems, California, USA) using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied

Biosystems, California, USA). The thermal cycling conditions consisted by an initial denaturation step of 95°C for 10 minutes, 50 cycles at 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute. The experiments were performed in triplicate for each data point. The ACE mRNA abundance was quantified as a relative value compared to an internal reference - β -actin. The primers used for real-time PCR were: ACE (forward primer: 5' TGA GAA AAG CAC GGA GGT ATC C 3'; reverse primer: 5' AGA GTT TTG AAA GTT GCT CAC ATC A 3'); murine β -actin (GenBank accession No. NM007393), forward primer 5' CTG GCC TCA CTG TCC ACC TT 3' and reverse primer 5' CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T 3'. The ACE and β -actin mRNA expressions were obtained from the cycle threshold (Ct) associated with the exponential growth of the PCR products. Quantitative values for ACE mRNA expression were obtained by the parameter $2^{-\Delta C_t}$, in which ΔC_t represents the subtraction of the β -actin Ct values from the ACE receptor values.

Measurement of ACE activity using the fluorescent peptide Abz-FRK (Dnp)P-OH

ACE activity measurements in all the transfected and non-transfected cells were performed using the FRET peptide Abz-FRK(Dnp)P-OH as described [19].

In silico studies

To perform the protein-protein docking calculations, we used the structural coordinates of ACE (PDB entry 1O8A) [20] and PLC β 3 (PDB entry 3OHM) [21], obtained by X-ray crystallography. To predict the structures of the complex ACE-PLC β 3 [21] we performed a rigid-body protein-protein docking with the program ZDOCK 3.02, a freely protein docking server. The result presenting the lowest interaction energy was selected and subsequently evaluated as a function of the centroid-centroid distance in order to estimate the potential energy profile for the ACE-PLC β 3 complex within the Universal classical force field [22] available in the Forcite Module of Materials Studio 5.5.

Statistical analysis

The results are expressed as mean values \pm SEM, except where otherwise noted. Prism (GraphPad Prism Software, San Diego, CA) and Image J (NIH; Bethesda, MD) softwares were used for data and image analysis, respectively. Statistical significance was tested using One-way ANOVA followed by Bonferroni test, and p value < 0.05 was taken to indicate statistical significance.

Results

Binding of Ang-II to ACE leads to the complex internalization

In addition to the well-known effects of ACE as an enzyme that converts Ang-I to Ang-II [23], ACE has also been reported as a new receptor for Ang-II [7, 9]. In order to investigate the role Ang-II plays through ACE binding, we used CHO cells stably expressing somatic human ACE expression (CHO-ACE cell), in comparison with cells transfected with AT $_1$ receptor (CHO-AT $_1$ cell). Since it is well known that upon stimulation, AT $_1$ receptors internalize [24, 25], we tested whether ACE undergoes a similar process upon Ang-II stimulation. In CHO-AT $_1$ and CHO-ACE cells treated with radiolabeled Ang-II (^3H -Ang-II), we found a more pronounced ^3H -Ang-II internalization upon binding to ACE than to AT $_1$ (Bmax in CHO-AT $_1$: $69.6 \pm 10.3\%$; Bmax in CHO-ACE: $79.6 \pm 5.7\%$, $n = 3$, $p < 0.05$), (Fig 1A). In order to check if this observation was not due to a matter of a difference on the expression level of

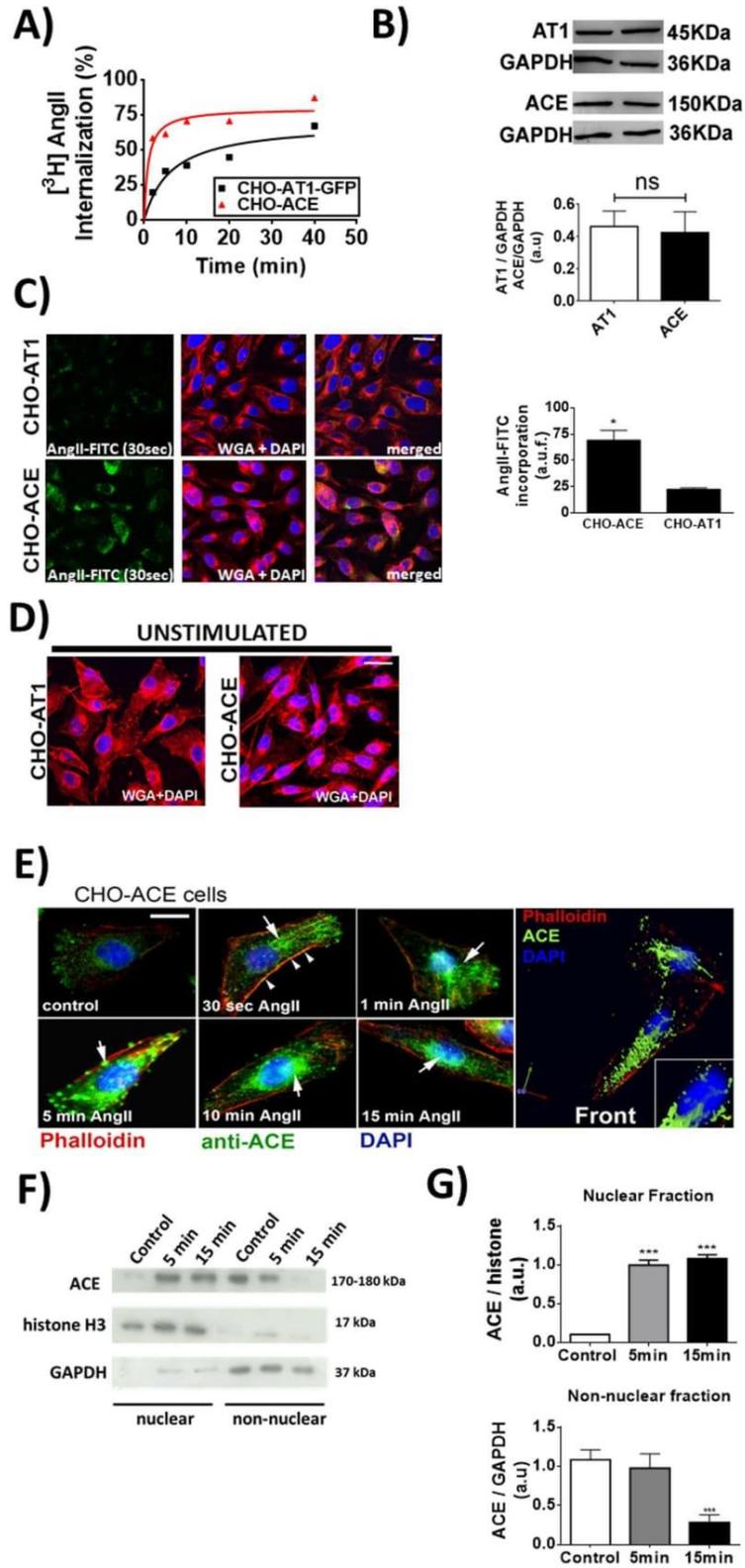


Fig 1. Ang-II induces ACE translocation to the nucleus. (A) Internalization of AT₁ and ACE in the presence of 4 nM ³H-Ang-II. Data are shown as mean from three independent experiments, each performed in duplicate. (B) CHO-ACE and CHO-AT₁ cells present the same relative protein level of each respective receptor. (Values are mean ± S.E.M., *p<0.05, n = 63 individual experiments). (C) Representative confocal images of internalized Ang-II-FITC (1 μM) in CHO-ACE and CHO-AT₁ cells after 30 seconds of Ang-II stimulation. DAPI (blue) and Wheat Germ Agglutinin (red), scale bar = 10 μm. On the right, quantification of internalized Ang-II-FITC is presented. Values are mean ± S.E.M., *p<0.05, n = 6. (D) Representative confocal images of unstimulated CHO-ACE and CHO-AT₁ cells, labeled for DAPI and WGA. (E) Immunolocalization of ACE after stimulation with Ang-II (1 μM), for the indicated times. ACE is shown in green, actin filaments in red, and nucleus in blue (DAPI). Right panel represents a 3D reconstruction of CHO-ACE cell after 15 minutes of incubation with Ang-II (1 μM). Scale bar = 10 μm. (F) Western blotting of nuclear and non-nuclear protein fractions from CHO-ACE cells, before (control) and after Ang-II (1 μM) stimulation for the indicated times. Histone-3 and GAPDH were used to show the purification of nuclear and non-nuclear protein fractions, respectively. (G) Densitometry analysis of the western blot. Values are mean ± S.E.M., n = 3 (***) p<0.01).

doi:10.1371/journal.pone.0165371.g001

AT₁ and ACE, we performed western blotting and observed that the total expression levels of ACE and AT₁ was the same (CHO-AT₁: 0.46 ± 0.045 vs CHO-ACE: 0.42 ± 0.07), (Fig 1B). Similarly, the amount of internalized Ang-II-FITC on CHO-ACE was significantly higher than that on CHO-AT₁ (CHO-ACE: 69.2 ± 9.3 a.u. vs CHO-AT₁: 22.6 ± 1.3 a.u., n = 3, p<0.01), (Fig 1C). Cell membranes of both cells were counterstained with Wheat Germ Agglutinin (WGA). The purpose of using WGA as a probe is that it is a member of the lectin family that binds to N-acetyl-D-glucosamine and sialic acid residues found on the surface of cell membranes. It has been used extensively to stain surface of membranes [26] better than the usage of phalloindin toxins, for example, which in turn label the actin cytoskeleton, providing an indirect labeling of the membrane and not this component itself. A WGA staining of unstimulated cells is shown in order to exclude any possible membrane reorganization due to Ang-II (Fig 1D).

Additionally, we observed that after Ang-II stimulation, ACE itself is also routed to the nucleus (Fig 1E). Nuclear and non-nuclear protein fraction, before and after Ang-II stimulation, confirmed the translocation of ACE from the cell membrane into the nuclear compartment (Nuclear fraction: Control = 0.1 ± 0.001 a.u., 5 min = 0.99 ± 0.09 a.u., 15 min = 1.08 ± 0.07 a.u.; Non-nuclear fraction: Control = 1.10 ± 0.01 a.u., 5 min = 0.94 ± 0.03 a.u., 15 min = 0.49 ± 0.04 a.u.; n = 3, p<0.01), (Fig 1F and 1G). Together, these results show that Ang-II induces internalization of ACE, and a subpopulation of these complexes translocates to the nucleus.

Phospholipase-C mediates the Ca²⁺ signals induced by ACE activation

The binding of Ang-II to ACE is known to cause intracellular Ca²⁺ increase, through InsP₃ formation [7]. We then investigated whether the membrane-associated phospholipase C (PLC) plays any role in the InsP₃-mediated Ca²⁺ signals induced by ACE activation. Our *in silico* modeling studies of ACE [27] and PLC Beta 3 (β3) isoform [28] structures, suggested that there is a direct interaction between these molecules, which is independent of G-protein (Fig 2A–2D). The ten top ranked docking poses obtained with ZDOCK are presented in Fig 2A. The interaction energy obtained for the best docking pose of PLCβ3, Pose 9 (Fig 2B), possess an energy value of -194.06 kcal/mol, within the Universal classical force field. Fig 2C shows the amino acid residues located at the interface between the best docking pose of PLCβ3 (left panel) and ACE (right panel), Pose 9, explored through docking protocols.

The importance of this interaction between PLC and ACE was experimentally validated by silencing of specific PLC isoforms followed by evaluation of Ang-II triggered Ca²⁺ signals in CHO-ACE cells. The effectiveness of silencing PLCβ3 or the PLC gamma (γ) isoforms was confirmed by western blotting (PLCβ3: Control = 100% vs siRNA PLCβ3 = 12 ± 0.15%; PLCγ: Control = 100% vs siRNA PLCγ = 24.5 ± 0.36%, n = 5, p<0.01 for each condition), (Fig 3A–3C).

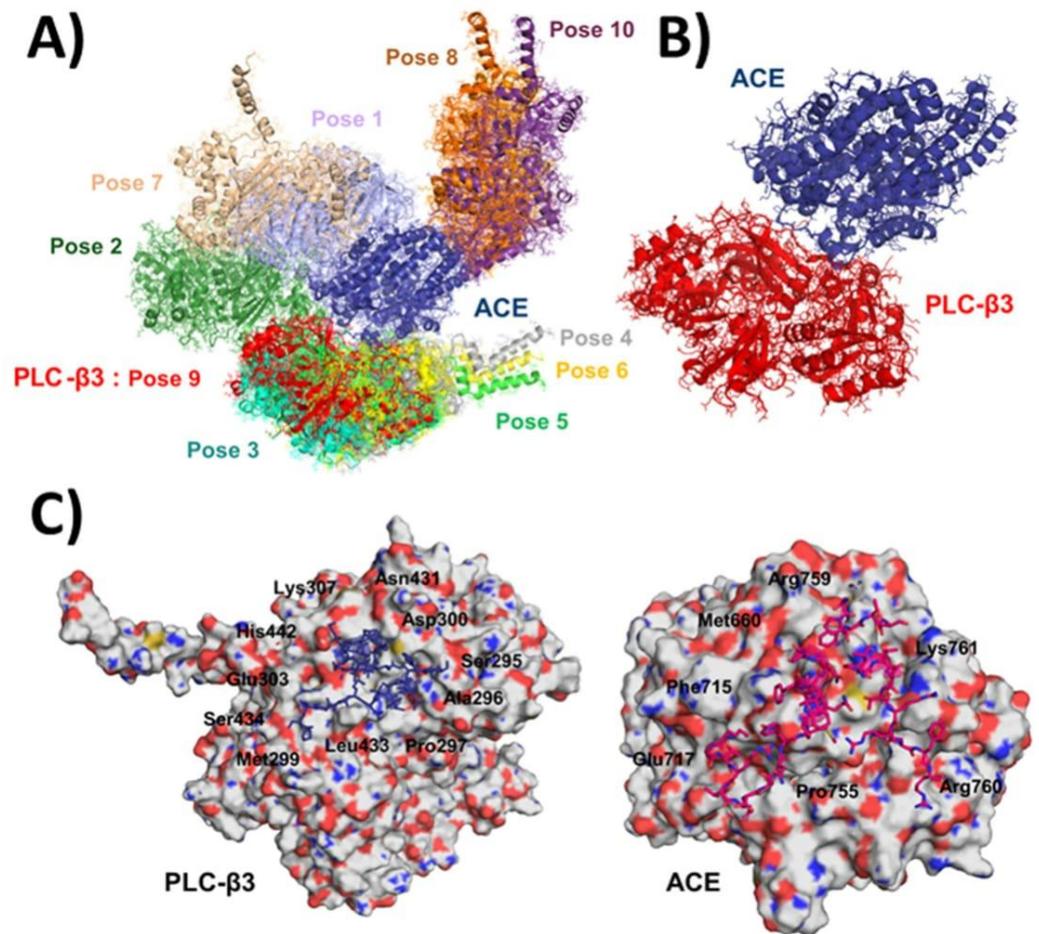


Fig 2. Molecular interaction between ACE and PLC by computational analysis in silico. (A) Representation of the ten top ranked docking poses for ACE (blue) with PLCβ3 protein superimposed (the color of the PLC protein pose correspond to the colors of the labels). (B) Structure of the complex between ACE (blue) and PLC-β3 (Pose 9, red). The binding energy for the best docking pose of ACE and PLC-β3, Pose 9, is -194.06 kcal/mol. (C) Amino acid residues located at the interface between the best docking pose of PLC-β3 (left panel) and ACE (right panel), Pose 9, explored through docking protocols.

doi:10.1371/journal.pone.0165371.g002

Silencing of PLCβ3 but not PLCγ in CHO-ACE decreased Ca²⁺ signaling induced by Ang-II (Control: 19.52 ± 2.2%, Lipo: 19.15 ± 0.85%, siRNA PLCβ3: 16.6 ± 1.9% and siRNA PLCγ: 16.57 ± 0.12% n = 3, p<0.01), (Fig 3D). Additionally, Ca²⁺ signals induced by Ang-II/ACE activation initiate and predominate in the nuclear compartment (Nucleus: 166.6 ± 43.2% vs Cytosol: 49.5 ± 15.8%, n = 3, p<0.05), (Fig 3E–3G). Together, these results indicate that upon Ang-II stimulation, ACE interacts with PLC to trigger an intracellular Ca²⁺ increase predominantly in the nucleus of CHO cells.

Clathrin regulates endocytosis of ACE

Since our previous demonstrated that nucleoplasmic Ca²⁺ regulates cell proliferation [12, 29, 30] and the activation of ACE by Ang-II caused preferential nuclear Ca²⁺ increase, we investigated the role of ACE in cell growth. Ang-II stimulated CHO-ACE cells to proliferate faster

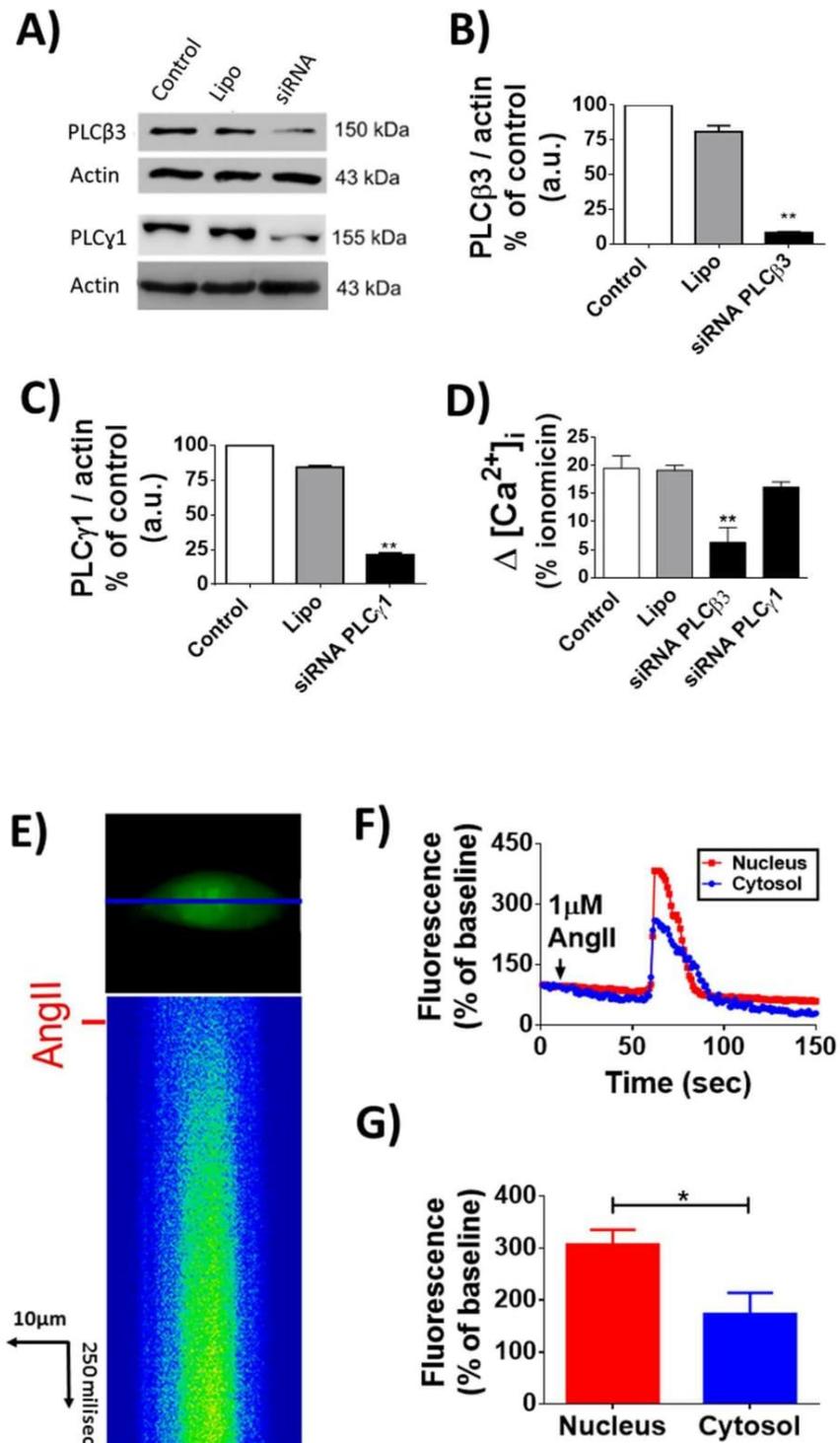


Fig 3. Effect of Ang-II on intracellular Ca^{2+} signaling in CHO-ACE cells. (A) Western immunoblotting to confirm the silencing of PLC isoforms. Densitometric analysis are shown on (B) for PLCβ3 and (C) for PLCγ1. (D) Quantitative representation of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in CHO-ACE cells transfected with siRNA-PLCβ3 and PLCγ1 using Lipofectamine and stimulated with Ang-II (1 μM). (E) Line scanning of Ca^{2+} signal in CHO-ACE. Ang-II promotes Ca^{2+} increase with greater intensity in the nuclear region. (F) Time course of Ca^{2+} signaling in the nucleus (red traces) and cytosol (blue traces). (G) Quantification of fluorescence intensity signal in the nucleus and cytosol. Values are mean ± S.E.M., (* p < 0.01), 45 cells, n = 3 individual experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0165371.g003

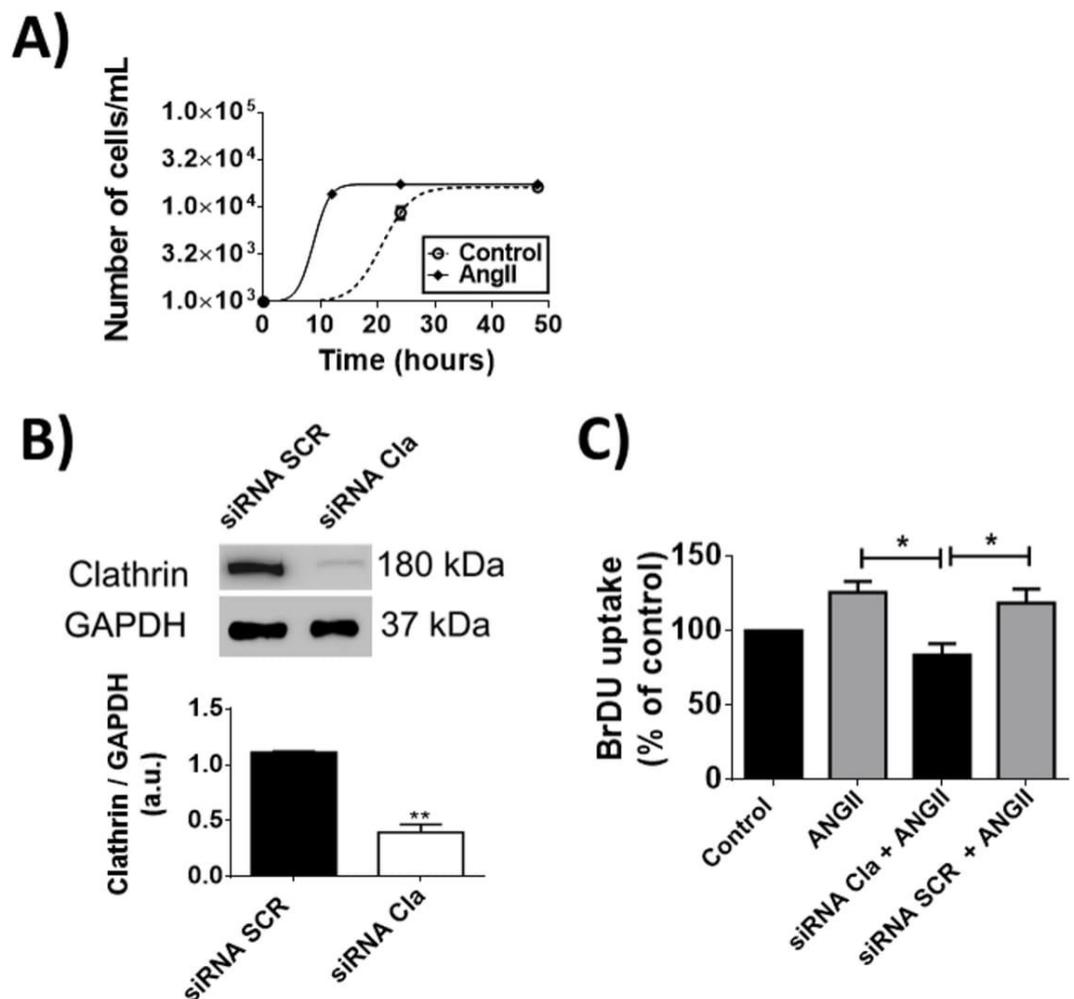


Fig 4. Cell proliferation induced by Ang-II/ACE involves clathrin-mediated internalization process. (A) Cell growth assay of CHO-ACE cells 12, 24 and 48 hours after stimulation with Ang-II ($1 \mu\text{M}$), triplicate in 3 individual experiments. (B) Western blot to confirm the silencing of clathrin (upper panel) and densitometry analysis (bottom panel). Mean \pm S.E.M., $n = 5$ (* $p < 0.05$). (C) BrDU incorporation is decreased in CHO-ACE cells transfected with siRNA-Cla (Clathrin) and stimulated with Ang-II ($1 \mu\text{M}$). Mean \pm S.E.M., $n = 6$ (* $p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0165371.g004

compared to control non-stimulated group (CHO-ACE cells reached $1.1 \pm 0.28 \times 10^4$ cells vs $1.5 \times 10^3 \pm 0.25$ cells from the control group, after 15 hours of incubation in the presence of Ang-II, $n = 4$, $p < 0.05$), (Fig 4A). Next, we investigated whether the nuclear translocation of ACE is necessary for the proliferative response. For that, we performed silencing of clathrin (Cla), which is involved in classic receptor endocytosis [31]. Our result showed an efficient silencing of Cla in CHO-ACE cells (siRNA SCR: 1.39 ± 0.01 vs siRNA Cla: 0.46 ± 0.025), (Fig 4B). BrDU assay showed that silencing of Cla inhibited cell proliferation stimulated by Ang-II on CHO-ACE cells (Data expressed as percentage of the control group. Ang-II: $25 \pm 4.34\%$, siRNA Cla + Ang-II: $0 \pm 5.4\%$, siRNA Scr + Ang-II: $20 \pm 6.56\%$, $n = 3$, $p < 0.05$), (Fig 4C). These results demonstrate that clathrin-mediated endocytosis is necessary to promote cell proliferation induced by Ang-II.

Ang-II/ACE regulates melanoma cell proliferation and migration

To further investigate the role of ACE on cell proliferation, we used the murine melanoma cells (TM-5), since TM-5 cells endogenously express ACE, but do not express AT₁ and AT₂ receptors [32]. ACE expression level is higher in TM-5 cells than in its control melanocyte counterpart, Melan-a cells (TM-5 cells: 1.1 ± 0.1 a.u. vs Melan-a cells: 0.14 ± 0.05 a.u., $n = 5$, $p < 0.01$), (Fig 5A). As expected, ACE activity is also more pronounced in TM-5 compared to Melan-a (0.42 ± 0.1 in melan-a vs 1.80 ± 0.42 in TM-5, $n = 3$, $p < 0.05$), (Fig 5B). No proliferation was observed in response to Ang-II stimulation in Melan-a cells (Control: 1.3 ± 0.2 Ang-II: 0.9 ± 0.1 , Lisi: 1.2 ± 0.3 , Lisi + Ang-II: 1 ± 0.2 , $n = 3$, $p = \text{ns}$), (Fig 5C). Conversely, BrDU incorporation was increased in TM-5 upon Ang-II, an effect that was prevented by pre-treatment with ACE inhibitor, Lisinopril (Control: 0.2 ± 0.1 , Ang-II: 0.6 ± 0.1 , Lisi: 0.2 ± 0.1 , Lisi + Ang-II: 0.19 ± 0.1 , $n = 3$, $p = < 0.01$), (Fig 5D).

To address the potential direct involvement of ACE in TM-5 cell proliferation, ACE expression was silenced in this cell type (Control: $5.93 \pm 0.2\%$, CNT: $5.78 \pm 0.16\%$, siRNA SCR: $4 \pm 0.1\%$ and siRNA ACE: $0.3 \pm 0.01\%$, $n = 3$, $p < 0.01$), (Fig 6A). In cells with reduced levels of

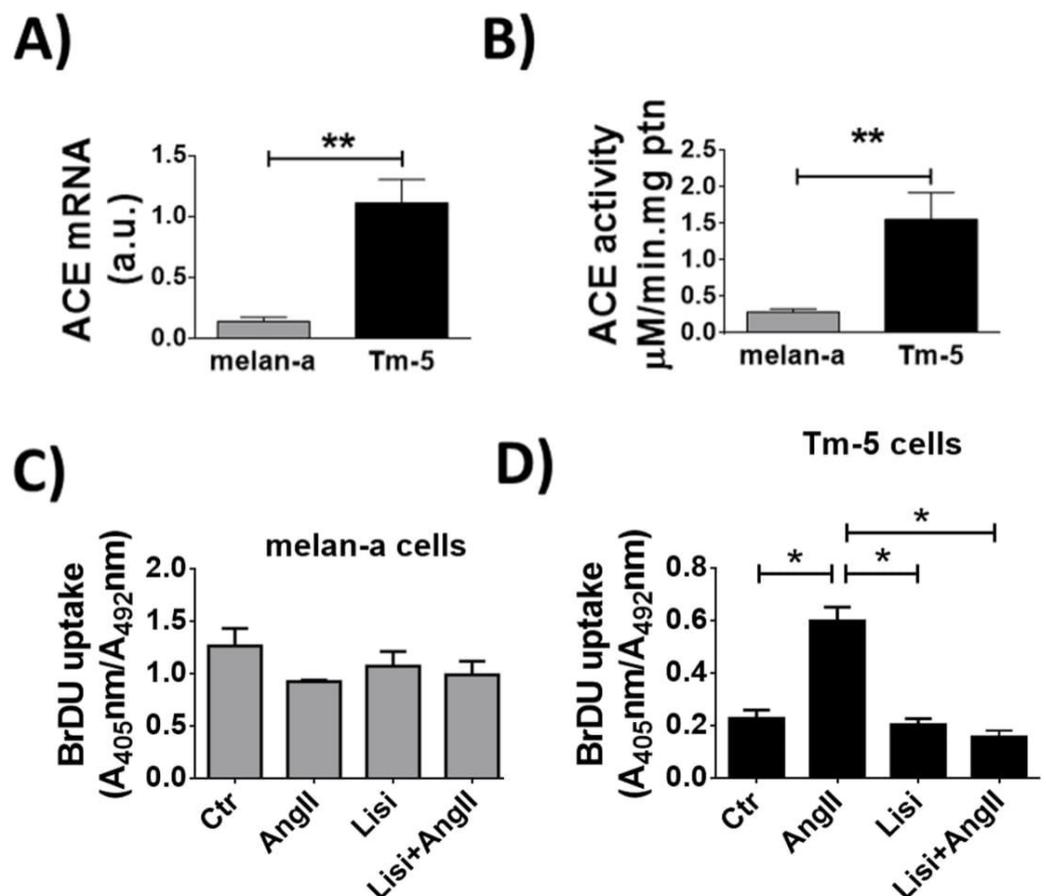


Fig 5. Ang-II stimulates proliferation in melanoma cells. (A) Real-Time PCR analysis for expression of ACE in melan-a and TM-5 cells. (B) ACE activity measured by cleavage of Abz-FRK(Dnp)P-OH in melan-a and TM-5 cells. For A and B, mean \pm S.E.M, $n = 6$ (** $p < 0.01$). (C-D) BrDU uptake assay 24 hours after stimulation with Ang-II ($1 \mu\text{M}$) in the presence of lisinopril ($1 \mu\text{M}$), showing inhibition of cell proliferation in TM-5 cells (D) but not in melan-a cells (C). Mean \pm S.E.M., $n = 6$. (* $p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0165371.g005

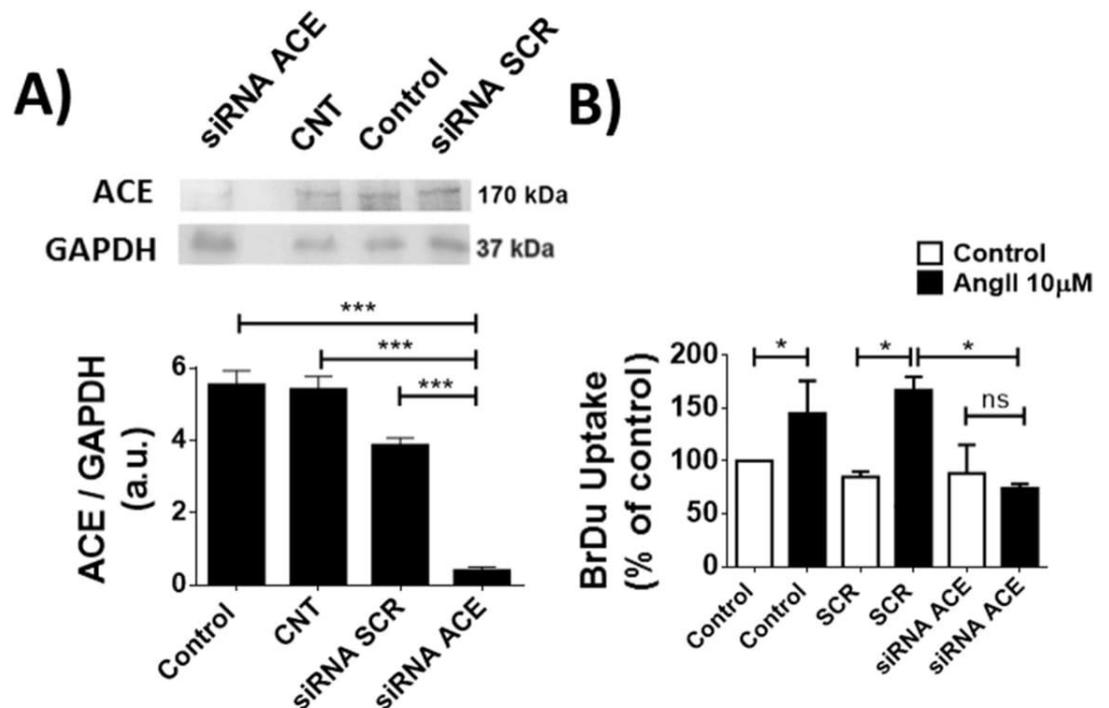


Fig 6. ACE silencing inhibits the proliferative effect of Ang-II in melanoma cells. (A) Western blot (upper panel) to confirm the silencing of ACE and densitometry analysis (bottom panel). Mean \pm S.E.M., $n = 8$. (***) $p < 0.01$ compared to respective columns). (B) BrDU uptake in TM5 cells silenced for ACE and stimulated for 24 hours with Ang-II (1 μ M), showing a decrease in BrDU incorporation in the absence of ACE. Mean \pm S.E.M., $n = 12$ (* $p < 0.05$; ns = non-significant).

doi:10.1371/journal.pone.0165371.g006

ACE, Ang-II was unable to induce TM-5 cell proliferation (Control: $147 \pm 23\%$, siRNA SCR: $172 \pm 9\%$ and siRNA ACE: $0 \pm 2\%$, $n = 4$, $p < 0.05$), (Fig 6B), indicating that ACE activation is involved in melanoma proliferative response triggered by Ang-II.

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer [33]. When it has spread (metastatic melanoma), the prognosis is very poor. Indeed, this type of skin cancer has a great capacity of migration [33]. To investigate whether Ang-II induces migration of melanoma cells, we performed a scratch assay in the presence or absence of Ang-II. Ang-II stimulated a faster healing process (Results expressed as the percentage of healing. FBS 12h: $37.7 \pm 3.1\%$, Ang-II 12h: $47.9 \pm 4.4\%$, FBS 24h: $44 \pm 5.1\%$, Ang-II 24h: $58.2 \pm 7.2\%$), (Fig 7A and 7B). Some recent findings showed that the filamentous (F)-actin-binding protein vinculin is required for cell polarization and migration [34], having a key role on the formation of focal adhesion points. In order to check if the increased healing observed during stimulation with Ang-II is due to alterations on the focal adhesion points, we performed immunofluorescence for vinculin. Under stimulation with Ang-II, TM-5 cells showed a decreased focal adhesion formation/ $1000\mu\text{m}^2$ (Control: 95.5 ± 23 , Ang-II 6h: 69.9 ± 15.4 , Ang-II 24h: 18.7 ± 9.8 , $n = 5$, $p < 0.05$), (Fig 7C–7E). Taken together, these data suggest that the reduction of focal adhesion observed in Ang-II stimulated melanocytes might contribute to the detachment and migration of melanoma cells.

Discussion

The major form of somatic ACE involves two very similar protein domains (N- and C-domains) [35, 36], with the C-domain of ACE responsible for Ang-II formation [37, 38], the principal final product of the renin-angiotensin system. However, ACE is a relatively

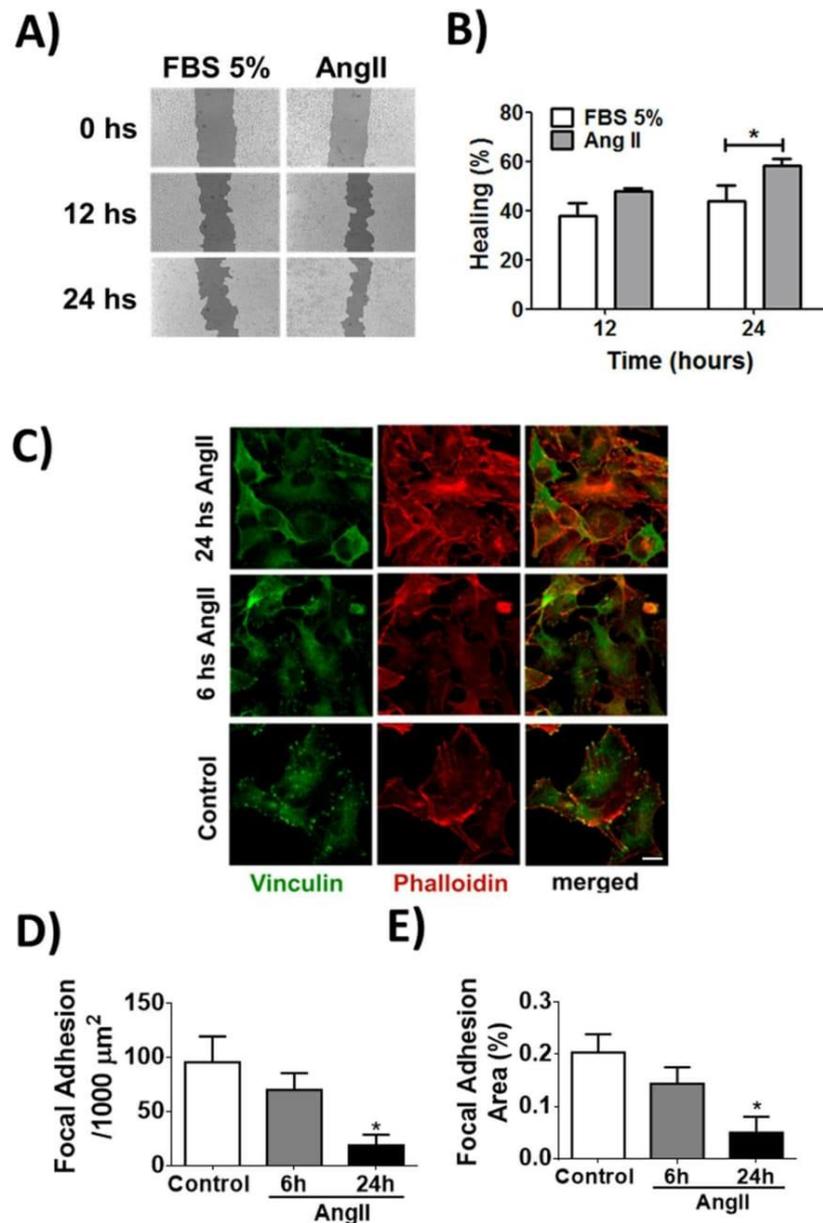


Fig 7. Ang-II promotes cellular migration and reduces focal adhesion formation in melanoma cells. (A-B) Wound healing assay using TM-5 cells stimulated with Ang-II (1 μM). C) Representative confocal images of TM-5 cells double-labeled with vinculin (green) and phalloidin (red). Scale bar = 10 μm . (D-E) Quantification of the focal adhesion formation. Mean \pm S.E.M., n = 6 (* p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0165371.g007

nonspecific peptidase that is capable of cleaving a wide range of substrates. Because of this, ACE and its peptide products affect many physiologic processes, involving blood pressure regulation, handling of electrolytes in the kidneys, hematopoiesis, reproduction, immune response among others [39]. Recently, evidence has been provided that ACE has kinase activity [4, 5] and also functions as a membrane receptor for Ang-II [7, 9]. Indeed, crystal structure of ACE c-domain in complex with Ang-II revealed detailed molecular interaction site between ACE and the peptide [9]. Once bound to ACE, Ang-II was shown to cause an InsP₃-dependent

intracellular Ca^{2+} increase [7]. In the current work, we showed that through ACE, Ang-II increases Ca^{2+} signals preferentially in the nucleus and modulates cellular functions such as proliferation and migration. We also demonstrated that ACE and Ang-II complex internalizes in a clathrin-dependent way.

Upon activation by ligand stimulation, several membrane receptors are internalized through the clathrin-coated endocytic pathway, suggesting an intranuclear signaling of both ligands and receptors [40]. For AT_1 receptor, its internalization is initiated by G protein-coupled receptors (GPCRs) kinases that promote phosphorylation of aminoacid residues within the cytoplasmic tail of the receptor [41]. After that, the phosphorylated receptor can interact with arrestins (β -arrestins-1 and -2), which in turn, promotes entry of the receptor into clathrin-coated pits [42]. Although we showed Cla took part on the ACE internalization, we have no evidences whether ACE interacts with β -arrestin in order to entry on clathrin-coated pits, as it has already been demonstrated for AT_1 and other GPCRs [41, 43, 44, 45].

In the endosome-mediated nuclear translocation, the internalized endosome is usually directed by the nuclear transporter importin proteins, which recognize the nuclear localization signal of the proteins and direct them to the nucleus through the nuclear pore complex [46, 47]. However, the nuclear localization signal is not predicted in the entire ACE sequence [48], therefore nuclear import of ACE may require other mechanisms. Indeed, several receptors tyrosine kinases (RTKs), that lack the nuclear localization signal, have also been reported to localize in the nucleus [48]. In this aspect, we have previously described that the nuclear accumulation of the hepatocyte growth factor (HGF) receptor requires Gab1 participation [13]. Gab1 is an adaptor protein that contains a nuclear localization sequence and by binding to the target protein regulates its active import to the nucleus [49]. It is possible that a similar mechanism mediates ACE nuclear translocation. Additional questions include whether Ang-II remains bound to nuclear ACE and whether the nuclear localization of ACE may take place only at specific stages of the cell cycle. While more studies need to be done to characterize the nuclear translocation of ACE/Ang-II complex, we are now demonstrating that this internalization process is essential to cause a preferential nuclear Ca^{2+} increase.

Intracellular Ca^{2+} signals mediated by InsP_3 rely on activation of PLC that causes hydrolysis of phosphatidylinositol bisphosphate (PIP_2) [50]. This activation typically depends on heterotrimeric G protein subunits, but can also be triggered by protein tyrosine kinases, small G proteins, and phospholipids [51]. We now show that ACE may directly interact with PLC, and that in CHO cells, the $\text{PLC}\beta_3$ isoform, but not the $\text{PLC}\gamma_1$, regulates the Ca^{2+} signals triggered by Ang-II/ACE pathway. One can thus speculate that the subpopulation of activated ACE that translocates to the nucleus might locally activate $\text{PLC}\beta_3$ to generate nuclear Ca^{2+} signals upon Ang-II stimulation. This is supported by data from other cell systems, which show expression of PLC family members not only at the plasma membrane, but also preferentially in the inner nuclear compartment [52]. Furthermore, a link between nuclear inositol lipid cycle and nuclear Ca^{2+} signal is well established, and the activation of this pathway has been shown to act independently from that at the plasma membrane [13, 53–58]. Moreover, it is known that mitogens such as insulin [53] and hepatocyte growth factor, once bound to their respective receptors [13] can lead to hydrolysis of the nuclear pool of PIP_2 , through a PLC-dependent mechanism, leading to a nuclear Ca^{2+} increase [50]. It is conceivable that a similar phenomenon occurs with ACE/Ang-II. However, since the selectively silencing of $\text{PLC}\beta_3$ did not completely abolish intracellular signals triggered by Ang-II and ACE interaction, we cannot exclude a partial contribution of other signaling molecules as well. Indeed, Guimarães and Alvarenga, 2011 [7] showed that either 2-APB (InsP_3 R antagonist) or Nifedipine (L-type voltage-gated Ca^{2+} channel blocker) were able to partially block ACE-evoked Ca^{2+} signaling in CHO-ACE cells, suggesting that, besides mobilizing intracellular Ca^{2+} stores, Ang-II binding

to ACE also affects the opening of the voltage-gated Ca^{2+} channels. Therefore, the partial blockage of Ca^{2+} signaling due PLC β signaling might be explained due the different Ca^{2+} pathways that are activated by Ang-II binding to ACE. Another possibility is that ACE/Ang-II links to a specific isoform of the InsP $_3$ R to trigger nuclear Ca^{2+} release. For instance, it is known that three InsP $_3$ receptor isoforms exist and they have distinct sensitivity to InsP $_3$ [50] and subcellular localizations, which would enable InsP $_3$ -mediated Ca^{2+} signals to occur preferentially in the nucleus, compared to the cytosol, after ACE activation [50].

Ca^{2+} signals within the nucleus are particularly important in cancer cell progression [50, 59, 60]. Buffering nuclear Ca^{2+} arrests adenocarcinoma cells in the early phase of mitosis [61], and sensitizes head and neck cancer cells to radiotherapy [59]. Therefore, the effect of Ang-II/ACE on nuclear Ca^{2+} signaling might explain the observed Ang-II's action as a mitogen, in the melanoma cell line (TM-5), a murine cell type that endogenously expresses ACE, but lack Ang-II type 1 or type 2 receptors. We further show that ACE is involved in TM-5 cell migration, another aspect of melanoma carcinogenesis. Melanoma is a common cancer in the Western world with an increasing incidence highly due to sun exposure [62]. Transformation of melanocytes into melanoma encompasses a complex interplay of both endogenous and exogenous factors and it is known that its metastasis pattern can occur during either an earlier or a later phase, being guided by genetic or phenotypic drivers [63, 64]. Although Ang-II has been reported to regulate growth, adhesion, invasion and cell migration in certain cancer cells [65], this is the first report of Ang-II-induced melanocytes proliferation and migration mediated by binding to ACE.

It is well-accepted that either ACE inhibitors or AT1 blockers are the gold standard drugs in order to manage hypertension, due their survival benefits provided on patients with heart failure, high cardiac risk profile and also proteinuric chronic kidney disease [66]. However, a combination therapy with ACE inhibitors and Ang-II receptor blockers has been extensively explored since the monotherapy has been shown efficient in only a quite limited number of hypertensive patients [67]. Another evidence that supports the usage of a combined therapy is the fact that monotherapy with ACE inhibitor increases the concentration of circulating Ang-I and this can partially mitigate inhibition of ACE, what turns out to restore the concentration of active Ang-II towards pretreatment levels [68, 69]. In addition to that, it is known that other enzymes distinct from ACE, and therefore not blocked by ACE inhibitors, can form Ang-II [70]. Indeed, patients with mild to moderate hypertension demonstrated a more prominent decrease in diastolic blood pressure when a combination therapy was used [71, 72]. However, the long-term effects of these combination therapies on blood pressure have still been questioned since they showed no benefits in terms of the composite of cardiovascular death, myocardial infarction, stroke and hospitalization for heart failure. In fact, it caused more symptoms attributable to hypotension, increased decline in renal function and need for dialysis compared to ACE inhibitor monotherapy [73].

There are several clinical evidences showing the chemopreventive effects of ACE-blocking in cancer [74]. The first evidence for the antitumor effects of ACE blockers was demonstrated in 1998 [75] in which the relative risk of fatal, incident and female-specific cancers was lower in women on ACE inhibitors [75]. In human squamous skin cancer cells, it was observed a prominent inhibitory effect on tumor growth and angiogenesis mediated by perindopril [76]. A similar finding was observed in a cohort study performed among a high-risk group of veterans using ACE inhibitors, showing a lower incidence of keratinocyte cancer when compared to nonusers. [77]. Specifically for cutaneous melanoma, captopril presented an antitumor activity in human melanoma xenograft model [78]. Additionally, it is already known that AT1 receptor plays an important role in angiogenesis and growth of tumor cell [79]. Administration of the AT1 blocker, TCV-116, significantly decreased melanoma tumor volume in mice

[80]. However, more clinical studies are still needed in order to justify the usage of ACE inhibitors or AT1 blockers for treating melanoma and other malignancies.

Taken together, our findings here suggest a novel function of ACE in the pathology of melanoma and open new paths to further studies, where ACE, as a receptor, might function as a possible therapeutic target aiming to avoid the progression of the disease.

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical assistance of Gilson Nogueira, and assistance of Jéssica S. Malta, Luiz Orlando Ladeira, Rodrigo R. Resende and Ana Cândida from Universidade Federal de Minas Gerais. We also thank Dr. Mateus Guerra from Yale University for the critical reading of the manuscript. This work was supported by FAPEMIG, CNPq, CAPES and INCT Nanocarbono–UFMG (Brazil).

Author Contributions

Conceptualization: EA MCF EM VF.

Formal analysis: EA MCF MFL.

Funding acquisition: MFL.

Investigation: EA MCF CCC RMF AF EM GF.

Methodology: EA MCF EM PG CB VF AC JBP AMP GF MFL.

Project administration: EA MCF MFL.

Resources: MFL PG VF AC JBP AMP.

Supervision: MFL.

Visualization: MCF MFL.

Writing – original draft: EA MCF GF MFL.

Writing – review & editing: EA MCF GF VF EM MFL.

References

1. Ferrario CM. The renin-angiotensin system: importance in physiology and pathology. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990; 15(3):S1–5.
2. Johnston CI, Fabris B and Jandeleit K. Intrarenal renin-angiotensin system in renal physiology and pathophysiology. *Kidney Int Suppl.* 1993; 42:S59–S63. PMID: [8361131](#)
3. Wang RF, Podos SM, Serle JB and Baltatu OC. Effect of SPP 635, a renin inhibitor, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes. *Experimental Eye Research.* 2012; 94:146–149. doi: [10.1016/j.exer.2011.11.019](#) PMID: [22173206](#)
4. Kohlstedt K, Brandes RP, Müller-Esterl W, Busse R, and Fleming I. Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. *Circ Res.* 2004; 94:60–67. doi: [10.1161/01.RES.0000107195.13573.E4](#) PMID: [14615289](#)
5. Fleming I. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ Res.* 2006; 98:887–896. doi: [10.1161/01.RES.0000217340.40936.53](#) PMID: [16614314](#)
6. Kohlstedt K, Busse R, and Fleming I. Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension.* 2005; 45:126–132. doi: [10.1161/01.HYP.0000150159.48992.11](#) PMID: [15569856](#)
7. Guimarães PB, Alvarenga EC, Siqueira PD, Paredes-Gamero EJ, Sabatiini RA, Morais RL, et al. Angiotensin II Binding to Angiotensin I-Converting Enzyme Triggers Calcium Signaling. *Hypertension.* 2001; 5 7(5):965–972.

8. Fyhrquist F and Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J. Intern. Med.* 2008; 264,224–236. doi: [10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x) PMID: [18793332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18793332/)
9. Masuyer G, Schwager SLU, Sturrock ED, Isaac RE and Acharya KR. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. *Sci Rep.* 2012; 2, 717 doi: [10.1038/srep00717](https://doi.org/10.1038/srep00717) PMID: [23056909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23056909/)
10. Aguiar CJ, Andrade VL, Gomes ER, Alves MN, Ladeira MS, Pinheiro AC, et al. Succinate modulates Ca²⁺ transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell Calcium.* 2010; 47: 37–46. doi: [10.1016/j.ceca.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.11.003) PMID: [20018372](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20018372/)
11. Ladeira MS, Andrade VA, Gomes ER, Aguiar CJ, Moraes ER, Soares JS, et al. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology.* 2010, 21: 385101. doi: [10.1088/0957-4484/21/38/385101](https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/38/385101) PMID: [20798464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20798464/)
12. Amaya MJ, Oliveira AG, Guimarães ES, Casteluber MCF, Carvalho SM, Andrade LM, et al. The insulin receptor translocates to the nucleus to regulate cell proliferation in liver. *Hepatology.* 2014; 59(1):274–283. doi: [10.1002/hep.26609](https://doi.org/10.1002/hep.26609) PMID: [23839970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23839970/)
13. Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, Gomez MV, Varnai P, Balla T, et al. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J.Biol.Chem.* 2008; 283:4344–4351. doi: [10.1074/jbc.M706550200](https://doi.org/10.1074/jbc.M706550200) PMID: [18073207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18073207/)
14. Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR and Nathanson MH. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat.Cell Biol.* 2003; 5:440–446. doi: [10.1038/ncb980](https://doi.org/10.1038/ncb980) PMID: [12717445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12717445/)
15. Thomas WG, Baker KM, Motel TJ and Thekkumkara TJ. Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. A role for residues on the hydrophobic face of a putative amphipathic helix. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (38), 22153–22159. PMID: [7673193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7673193/)
16. Leite MF, Page EC and Ambler SK. Regulation of atrial natriuretic peptide secretion by endothelin-1: desensitization and receptor subtype. *Am J Physiol.* 1994; 267: H2193–203. PMID: [7810719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7810719/)
17. Liang CC, Park AY and Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007; 2(2):329–333. doi: [10.1038/nprot.2007.30](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30) PMID: [17406593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406593/)
18. Kapoor M, Liu S, Shi-wen X, Huh K, McCann M, Denton CP, et al. GSK-3beta in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2008; 118(10):3279–3290. doi: [10.1172/JCI35381](https://doi.org/10.1172/JCI35381) PMID: [18802478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18802478/)
19. Sabatini RA, Bersanetti PA, Farias SL, Juliano L, Juliano MA, Casarini DE, et al. Determination of angiotensin I-converting enzyme activity in cell culture using fluorescence resonance energy transfer peptides. *Anal Biochem.* 2007; 15:255–262.
20. Inducible K, Ramanathan N, Sylva S, and Edward S. Crystal Structure of the Human Enzyme–Lisinopril Complex. *Nature.* 2003; 1429(1995): 1427–1429.
21. Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, Tsuboi K, et al. Kinetic Scaffolding Mediated by a Phospholipase C-β and Gq Signaling Complex. *Structure.* 2010; 21:974–981.
22. Pierce BG, Hourai Y and Weng Z. Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. *PLoS One;* 2011; 6(9):246–257.
23. Masuyer G, Yates CJ, Sturrock ED and Acharya KR. Angiotensin-I converting enzyme (ACE): structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence. *Biol Chem.* 2014; 395(10):1135–1149. doi: [10.1515/hsz-2014-0157](https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0157) PMID: [25205727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25205727/)
24. Petrel C and Clauser E. Angiotensin II AT1 receptor constitutive activation: From molecular mechanisms to pathophysiology. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 302(2): 176–184. doi: [10.1016/j.mce.2008.10.049](https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.049) PMID: [19061936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19061936/)
25. Bhuiyan MA1, Hossain M, Nakamura T, Ozaki M and Nagatomo T. Internalization of constitutively active N111G MUTANT of AT1 receptor induced by angiotensin II-receptor antagonists candesartan, losartan, and telmisartan: comparison with valsartan. *J Pharmacol Sci.* 2010; 112(4):459–62. PMID: [20308802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20308802/)
26. Andrade LM, Geraldo JML, Gonçalves OX, Leite MTT, Catarina AM, Guimarães MM, et al. Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma to Anticancer Therapy. *J Cancer Sci Ther.* Volume 2012; 4(5): 131–139.
27. Hooper NM and Turner AJ. An ACE structure. *Nature structural biology.* 2003; 10(3): 155–157. doi: [10.1038/nsb0303-155](https://doi.org/10.1038/nsb0303-155) PMID: [12605218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12605218/)
28. Koss H, Bunney TD, Behjati S and Katan M. Dysfunction of phospholipase C- gamma in immune disorders and cancer *Trends Biochem. Sci.* 2014; 39:603–611.

29. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W, et al. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:17061–17068. doi: [10.1074/jbc.M700490200](https://doi.org/10.1074/jbc.M700490200) PMID: [17420246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17420246/)
30. Andrade LM, Geraldo JML, Gonçalves OX, Leite MTT, Catarina AM, Guimarães MM, et al. Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma to Anticancer Therapy. *J Cancer Sci Ther.* Volume 2012; 4(5): 131–139.
31. Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC and Wakeham DE. Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17:517–568. doi: [10.1146/annurev.cellbio.17.1.517](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.517) PMID: [11687498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687498/)
32. Correa M, Machado J, Carneiro CR, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, et al. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int J Cancer.* 2005; 114:356–363. doi: [10.1002/ijc.20673](https://doi.org/10.1002/ijc.20673) PMID: [15573371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15573371/)
33. Miller AJ and Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006; 355(1):51–65. doi: [10.1056/NEJMra052166](https://doi.org/10.1056/NEJMra052166) PMID: [16822996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16822996/)
34. Thievensen N, Fakhri J, Steinwachs V, Kraus RS, Mclsaac L, Gao BC et al. Vinculin is required for cell polarization, migration, and extracellular matrix remodeling in 3D collagen. *FASEB J.* 2015; 29:4555–4567 doi: [10.1096/fj.14-268235](https://doi.org/10.1096/fj.14-268235) PMID: [26195589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26195589/)
35. Acharya KR, Sturrock ED, Riordan JF and Ehlers MR. ACE revisited: a new target for structure-based drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 891–902. doi: [10.1038/nrd1227](https://doi.org/10.1038/nrd1227) PMID: [14668810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14668810/)
36. Watermeyer JM, Kroger WL, Sturrock ED and Ehlers MR. Angiotensin converting enzyme—New insights into structure, biological significance and prospects for domain-selective inhibitors. *Current Enzyme Inhibition.* 2009; 5:134–147.
37. Fuchs S, Xiao HD, Hubert C, Michaud A, Campbell DJ, Adams JW, et al. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. *Hypertension.* 2008; 51, 267–274. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.097865](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.097865) PMID: [18158355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18158355/)
38. Van Esch JH, Tom B, Dive V, Batenburg WW, Georgiadis D, Yiotakis A, et al. Selective angiotensin-converting enzyme C-domain inhibition is sufficient to prevent angiotensin I-induced vasoconstriction. *Hypertension* 2005; 45:120–125. doi: [10.1161/01.HYP.0000151323.93372.f5](https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000151323.93372.f5) PMID: [15583077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15583077/)
39. Gonzalez-Villalobos RA, Janjoulia T, Fletcher NK, Giani JF, Nguyen MT, Riquier-Brison AD, et al. The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. *J Clin Invest.* 2013; 123:2011–2023. doi: [10.1172/JCI65460](https://doi.org/10.1172/JCI65460) PMID: [23619363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23619363/)
40. Sorkin A and Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res.* 2008; 314:3093–3106. doi: [10.1016/j.yexcr.2008.08.013](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.08.013) PMID: [18793634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18793634/)
41. Ahn S, Shenoy SK, Wei H and Lefkowitz RJ. Differential kinetic and spatial patterns of (beta)-arrestin and G-protein-mediated ERK activation by the angiotensin-II receptor. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 35518–35525. doi: [10.1074/jbc.M405878200](https://doi.org/10.1074/jbc.M405878200) PMID: [15205453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15205453/)
42. Kule CE, Karoor V, Day JNE, Thomas WT, Baker KM, Dinh D, et al. Agonist-dependent internalization of the angiotensin II type one receptor (AT1): role of C-terminus phosphorylation in recruitment of h-arrestins. *Regulatory Peptides.* 2004; 120:141–148. doi: [10.1016/j.regpep.2004.03.001](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.03.001) PMID: [15177932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15177932/)
43. Touyz RM and Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52:639–672. PMID: [11121512](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11121512/)
44. Pierce KL and Lefkowitz RJ. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; 2: 727–733. doi: [10.1038/35094577](https://doi.org/10.1038/35094577) PMID: [11584310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11584310/)
45. Drake MT, Shenoy SK and Lefkowitz RJ. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* 2006; 99: 570–582. doi: [10.1161/01.RES.0000242563.47507.ce](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000242563.47507.ce) PMID: [16973913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16973913/)
46. Huotari J and Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 2011; 30:3481–500. doi: [10.1038/emboj.2011.286](https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286) PMID: [21878991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21878991/)
47. Izaurralde E. and Adam S. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA.* 1998; 4: 351–364 PMID: [9630243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9630243/)
48. Lucero HA, Kintsurashvili E, Marketou ME and Gavras H. Cell Signaling, Internalization, and Nuclear Localization of the Angiotensin Converting Enzyme in Smooth Muscle and Endothelial Cells. *J Biol Chem.* 2010; 285(8): 5555–5568. doi: [10.1074/jbc.M109.074740](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074740) PMID: [20022959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20022959/)
49. Gu H and Neel BG. The “Gab” in signal transduction. *Trends Cell Biol.* 2003; 13: 122–130. PMID: [12628344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12628344/)
50. Oliveira AG, Guimaraes ES, Andrade LM, Menezes GB and Leite MF. Decoding Calcium Signaling Across the Nucleus. *Physiology.* 2014; 29: 361–368. doi: [10.1152/physiol.00056.2013](https://doi.org/10.1152/physiol.00056.2013) PMID: [25180265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25180265/)

51. Kadamur G and Ross EM. Mammalian Phospholipase C. *Annual Review of Physiology*. 2013; 75: 127–154. doi: [10.1146/annurev-physiol-030212-183750](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183750) PMID: [23140367](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23140367/)
52. Kim CG, Park D and Rhee SG. The role of carboxyl-terminal basic amino acids in Gq alpha-dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C-beta 1. *J Biol Chem*. 1996; 271: 21187–21192. PMID: [8702889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8702889/)
53. Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, Leite, MF and Nathanson MH. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology*. 2008; 48:1621–1631. doi: [10.1002/hep.22424](https://doi.org/10.1002/hep.22424) PMID: [18798337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18798337/)
54. Divecha N, Banc H and Irvine RF. The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J*. 1991; 10: 3207–3214. PMID: [1655412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1655412/)
55. Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L and Cocco L. Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature*. 1992; 358: 242–245. doi: [10.1038/358242a0](https://doi.org/10.1038/358242a0) PMID: [1321347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1321347/)
56. York JD, Satz E and Majerus PW. Inositol Polyphosphate 1-Phosphatase Is Present in the Nucleus and Inhibits DNA Synthesis *J. Biol. Chem*. 1994; 269: 19992–19999. PMID: [8051083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8051083/)
57. Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Ognibene A, Manzoli FA and Irvine RF. Rapid changes in phospholipid metabolism in the nuclei of Swiss 3T3 cells induced by treatment of the cells with insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 154(3):1266–1272. PMID: [2841931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2841931/)
58. Manzoli L, Billi AM, Gilmour RS, Martelli AM, Matteucci A, Rubbini S, et al. Phosphoinositide signaling in nuclei of friend-cells-tiazofurin down-regulates phospholipase-C beta (1). *Cancer Res*. 1995; 55:2978–2980 PMID: [7606713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7606713/)
59. Andrade LM, Geraldo JM, Goncalves OX, Meite MT, Anderson MC, Yokoo S, et al. Nucleoplasmic Calcium Buffering Sensitizes Human Squamous Cell Carcinoma To Anticancer Therapy. *Journal of Cancer Science & Therapy*. 2012; 4: 131–139.
60. Rodrigues MA, DA, Nathanson MH and Leite MF. Nuclear Calcium signaling: a cell within a cell. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009; 42:17–20. PMID: [18982194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18982194/)
61. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lan W, et al. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282: 17061–17068. doi: [10.1074/jbc.M700490200](https://doi.org/10.1074/jbc.M700490200) PMID: [17420246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17420246/)
62. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013; 499: 214–218. doi: [10.1038/nature12213](https://doi.org/10.1038/nature12213) PMID: [23770567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770567/)
63. Damsky WE, Theodosakis N and Bosenberg M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene*. 2014; 33:2413–2422. doi: [10.1038/onc.2013.194](https://doi.org/10.1038/onc.2013.194) PMID: [23728340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23728340/)
64. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer*. 2009; 9:302–312. doi: [10.1038/nrc2627](https://doi.org/10.1038/nrc2627) PMID: [19308069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19308069/)
65. Rodrigues-Ferreira S, Abdelkarim M, Dillenburg-Pilla P, Luissint AC, di-Tomasso A, Deshayes F. et al. Angiotensin-II facilitates breast cancer cell migration and metastasis. *PLoS One*. 2012; 7: 35667.
66. Sica DA. Combination ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker therapy—future considerations. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2007; 9(1):78–86.
67. Taddei S. Combination therapy in hypertension: what are the best options according to clinical pharmacology principles and controlled clinical trial evidence? *Am J Cardiovasc Drugs*. 2015; 15(3): 185–94. doi: [10.1007/s40256-015-0116-5](https://doi.org/10.1007/s40256-015-0116-5) PMID: [25850749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25850749/)
68. Ménard J, Guyene TT, Chatellier G, Kleinbloesem CH and Bernadet P. Renin release regulation during acute renin inhibition in normal volunteers. *Hypertension*. 1991; 18(3):257–265. PMID: [1889841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1889841/)
69. van den Meiracker AH, Man in 't Veld AJ, Admiraal PJ, Ritsema van Eck HJ, Boomsma F, Derckx FH, et al. Partial escape of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition during prolonged ACE inhibitor treatment: does it exist and does it affect the antihypertensive response? *J Hypertens*. 1992; 10(8):803–812. PMID: [1325513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1325513/)
70. Caughey GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev*. 2007; 217:141–54. doi: [10.1111/j.1600-065X.2007.00509.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00509.x) PMID: [17498057](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17498057/)
71. Azizi M, Linhart A, Alexander J, Goldberg A, Menten J, Sweet C, et al. Pilot study of combined blockade of the renin-angiotensin system in essential hypertensive patients. *J Hypertens*. 2000; 18:1139–1147. PMID: [10954007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10954007/)
72. Stergiou GS, Skeva II, Baibas NM, Roussias LG, Kalkana CB, Achimastos AD, et al. Additive hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin-receptor antagonism in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 35:937–941. PMID: [10836730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10836730/)

PLOS ONE

Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-dependent nuclear calcium signals regulate angiogenesis and cell motility in triple negative breast cancer

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Inositol 1, 4, 5-trisphosphate-dependent nuclear calcium signals regulate angiogenesis and cell motility in triple negative breast cancer
Short Title:	Nuclear calcium regulates breast cancer angiogenesis and migration
Corresponding Author:	Maria de Fátima Leite Federal University of Minas Gerais Belo Horizonte, Minas Gerais BRAZIL
Keywords:	Nuclear calcium, breast cancer, angiogenesis, cell migration
Abstract:	Increases in nuclear calcium concentration generate specific biological outcomes that differ from those resulting from increased cytoplasmic calcium. Nuclear calcium effects on tumor cell proliferation are widely appreciated; nevertheless, its involvement in other steps of tumor progression is not well understood. Therefore, we evaluated whether nuclear calcium is essential in other additional stages of tumor progression, including key steps associated with the formation of the primary tumor or with the metastatic cascade. We found that nuclear calcium buffering impaired 4T1 triple negative breast cancer growth not just by decreasing tumor cell proliferation, but also by enhancing tumor necrosis. Moreover, nuclear calcium regulates tumor angiogenesis through a mechanism that involves the upregulation of the anti-angiogenic C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10-IP10). In addition, nuclear calcium buffering regulates breast tumor cell motility, culminating in less cell invasion, likely due to enhanced vinculin expression, a focal adhesion structural protein. Together, our results show that nuclear calcium is essential for triple breast cancer angiogenesis and cell migration and can be considered as a promising strategic target for triple negative breast cancer therapy.
Order of Authors:	Erika Guimarães Rodrigo Machado Clarissa Fátima Carvalho Matheus de Castro Fonseca Ana Cândida Araújo e Silva Brígida Almeida Puebla Cassini Barbara Hissa Luciana Drumond Carlos Gonçalves Gabriel Fernandes Marina De Brot Marcio Moraes Lucíola Barcelos José Miguel Ortega André Oliveira Maria de Fátima Leite
Opposed Reviewers:	

