



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ANA KARLA BITTENCOURT MENDES

**MECANISMO DE AÇÃO DA $1\alpha,25$ -DIHIDROXIVITAMINA D_3 NA
HOMEOSTASIA DA GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE
RATOS: ESTUDOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E *IN SILICO***

FLORIANÓPOLIS

2022

Ana Karla Bittencourt Mendes

**MECANISMO DE AÇÃO DA 1 α ,25-DIHIIDROXIVITAMINA D₃ NA HOMEOSTASIA
DA GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS: ESTUDOS *IN VIVO*, *IN*
VITRO E *IN SILICO***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Mena Barreto Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Joana Margarida Navalho Gaspar

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mendes, Ana Karla Bittencourt

Mecanismo de ação da 1 α ,25-dihidroxitamina D3 na homeostasia da glicose em ilhotas pancreáticas de ratos: estudos in vivo, in vitro e in silico / Ana Karla Bittencourt Mendes ; orientadora, Fátima Regina Mena Barreto Silva, coorientadora, Joana Margarida Navalho Gaspar, 2022.

128 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. 1 α ,25(OH) $_2$ Vitamina D3. 3. Células ? pancreáticas. 4. Secreção de insulina. 5. Dinâmica Molecular. I. Silva, Fátima Regina Mena Barreto. II. Gaspar, Joana Margarida Navalho. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Ana Karla Bittencourt Mendes

Mecanismo de ação da 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ na homeostasia da glicose em ilhotas pancreáticas de ratos: estudos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Eduardo Benedetti Parisotto, Dr.
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof.^a Fabiana Ourique da Silva, Dr.^a
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Orientadora
Prof.^a Dr.^a Fátima Regina Mena Barreto Silva,

Florianópolis, 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de poder realizar mais um sonho em minha vida.

Agradeço à minha orientadora Fátima Regina Mena Barreto Silva, por toda atenção, acolhimento, paciência e ensinamentos que contribuíram grandemente para minha evolução e amadurecimento.

Agradeço à minha co-orientadora Joana M. Gaspar, pela grande contribuição, carinho e incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu marido e parceiro de vida, Gabriel P. da Luz, por todo apoio, compreensão e carinho incondicionais, que foram decisivos para a finalização de mais esta jornada.

Agradeço aos meus pais, Shirley B. Mendes e Jacinto Mendes, meus alicerces, pois sem eles certamente eu não chegaria até aqui. Agradeço à minha irmã, Laís B. Mendes e ao meu cunhado, André C. Doin, pela torcida e pelos momentos de alegria.

Agradeço às minhas amigas de laboratório e companheiras de experimentos, que se tornaram amigas para a vida toda, Paola M. Sulis, Betina Dambrós, Vanessa Staldoni e Fernanda C. Cavalari, obrigada por toda força e companheirismo durante este tempo.

Agradeço a professora Rozângela Curi Pedrosa pela oportunidade de parcerias e viabilidade de novos projetos.

Agradeço aos pesquisadores Valdelúcia Grinevicius e Graziâni Candioto pela parceria e pelos ensinamentos compartilhados.

Agradeço à equipe técnica do Laboratório Multi-usuário de estudos Biológicos (LAMEB) por toda a assistência, infra-estrutura e suporte técnico.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Farmácia (PPG-FAR) e às agências de fomento CAPES e CNPq, e à Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realizar este trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (SCHOPENHAUER)

RESUMO

O metabólito ativo da vitamina D₃ (1,25-D₃) está relacionado a efeitos benéficos no metabolismo da glicose através do aumento da secreção e melhora da sensibilidade à insulina. A enzima ERp57 é descrita por interagir com isômeros da 1,25-D₃ (6-*s-cis* e 6-*s-trans*) e ativar cascatas de sinalização intracelulares, como a via MAPK/ERK1/2, que contribui para a sobrevivência das células β pancreáticas. Neste trabalho foi estudado o efeito da 1,25-D₃ e do colecalciferol na glicemia de ratos normoglicêmicos e resistentes à insulina, bem como, a resposta rápida da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ e o papel da via MAPK/ERK 1/2 no mecanismo de ação, para secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos. Interações entre isômeros da 1,25-D₃ com ERp57, PKCα foram investigadas através de simulações computacionais. *In vivo*: ratos *Wistar* em jejum (2 h) foram divididos em cinco grupos experimentais: Controle (NaCl 0,9%), 1,25-D₃ (20 µg/ml/ Kg; *i.p.*), colecalciferol (2.640 UI; 1.8 nM; *g.o.*), dexametasona (0,1 mg/mL; *i.p.*), 1,25-D₃ + dexametasona e colecalciferol + dexametasona. Os compostos foram administrados durante 5 dias antes de realizar o teste de tolerância à insulina (TTI; 0,2 U/ Kg; *i.p.*). Após o TTI, foram quantificados glicemia, AST, ALT, γ-GT, LDH, CT, TG, cálcio total e glicogênio hepático. *In vitro*: após o equilíbrio de ⁴⁵Ca²⁺, ilhotas pancreáticas isoladas foram incubadas com ou sem 1,25-D₃ (1 nM - 1 min) ou ativador/bloqueador de canais/proteínas. Radioatividade e proteínas foram quantificadas. Insulina estática foi determinada por ELISA. A co-localização de p-ERK1/2, na presença/ausência de PD 98-059, foi investigada por imunofluorescência. *In silico*: ERp57 (PDB: 3F8U) e PKC (PDB: 3PFQ) foram obtidas por modelo de homologia (SwissModel); os ligantes 6-*s-cis* (LUM; MarvinSketch; ChemAxon v.20.17; UCSF Chimera) e 6-*s-trans* (VDX; Dock Prep; UCSF Chimera v. 1.14) foram minimizados. As poses docadas com menor energia de ligação (Autodock Vina; RMSD, 0,0000) foram submetidas as simulações de dinâmica molecular (GROMACS; modelo de água TIP3P; GAFF; 10 ns). Neste trabalho, observamos que *in vivo*, a 1,25-D₃ preveniu a resistência à insulina, no entanto, o colecalciferol não reproduziu efeito semelhante. A 1,25-D₃ reduziu o conteúdo de AST e ALT, LDH e CT e aumentou TG e cálcio total. Estudos *in vitro* mostraram que a 1,25-D₃ estimulou fosforilação de MAPK/ERK1/2, influxo de ⁴⁵Ca²⁺ e secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos. O efeito estimulatório da 1,25-D₃ foi inibido por diazoxide, apamina, tapsigargina, dantrolene, 2-APB, nifedipina, TEA, Ro 32-0432, KT-5720; e aumentado pela glibenclamida e *N*-etilmaleimida. *In silico*, ERp57 ou PKCα tiveram interações energéticas favoráveis com LUM e VDX. A estabilidade dos complexos proteínas-ligantes refletiu-se na menor variação dos valores de RMSD. LUM ou VDX interagiram por ligações de hidrogênio a ERp57 ou a PKCα em uma cavidade hidrofóbica com áreas superficiais relacionadas. De acordo com estes resultados pode-se concluir que o efeito estimulatório da 1,25-D₃ nas células β pancreáticas envolve a ativação dos canais L-VDCC, K⁺-ATP e K⁺-Ca²⁺, que contribuem para a despolarização celular. Essas alterações iônicas também ativam participantes à jusante. Após aumento intracelular abrupto de cálcio e secreção de insulina, a ativação dos canais K_v é crucial para repolarização celular. As predições *in silico* sugerem que LUM e VDX interagem com ERp57 e PKCα, podendo desencadear e ativar respostas rápidas não genômicas (via MAPK/ERK1/2), que contribuem para sobrevivência de células β pancreáticas de ratos. De modo geral, estes dados apontam que as proteínas estudadas são possíveis alvos terapêuticos, juntamente com o papel da 1,25-D₃ como adjuvante em quadros de hiperglicemia.

Palavras-chave: 1α,25(OH)₂ Vitamina D₃. Cálcio. MAPK/ERK1/2. Células β pancreáticas. Secreção de insulina. ERp57. PKCα. Docking Molecular. Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

The active metabolite of vitamin D₃ (1,25-D₃) is related to beneficial effects on glucose metabolism by increasing insulin secretion and improving insulin sensitivity. The enzyme ERp57 is described to interact with isomers of 1,25-D₃ (6-*s-cis* and 6-*s-trans*) and activate intracellular signaling cascades, as well as, the MAPK/ERK1/2 pathway, which contributes to pancreatic β cell survival. In this work, the effect of 1,25-D₃ and cholecalciferol on glycemia of euglycemic and insulin-resistant rats were studied, as well as, the rapid response of 1,25-D₃ in the ⁴⁵Ca²⁺ influx and the role of the MAPK/ERK1/2 pathway in its mechanism of action, for insulin secretion in isolated pancreatic islets from rats. Interactions between isomers of 1,25-D₃ with ERp57, PKCα were investigated through computational simulations. *In vivo*: fasting *wistar* rats (2 h) were divided: Control (NaCl 0.9%), 1,25-D₃ (20 μg/ml/ Kg, *i.p.*), cholecalciferol (2,640 IU; 1.8 nM; *o.g.*), dexamethasone (0.1 mg/ mL, *i.p.*), 1,25-D₃ + dexamethasone and cholecalciferol + dexamethasone. All compounds were administered during 5 days prior to insulin (0.2 U/ Kg; *i.p.*). After ITT, glycemia, AST, ALT, γ-GT, LDH, CT, TG, total calcium and hepatic glycogen were quantified. *In vitro*: after ⁴⁵Ca²⁺ equilibrium, isolated pancreatic islets were incubated with/without 1,25-D₃ (1 nM - 1 min) or channels/proteins activator/blocker. Radioactivity and proteins were quantified. Static insulin was determined by ELISA. The co-localization of p-ERK1/2, in the presence/absence of PD 98-059, was performed by immunofluorescence. *In silico*: ERp57 (PDB: 3F8U) and PKC (PDB: 3PFQ) proteins were obtained through homology model (SwissModel); ligands 6-*s-cis* (LUM; MarvinSketch; ChemAxon v.20.17; UCSF Chimera) and 6-*s-trans* (VDX; Dock Prep; UCSF Chimera v. 1.14) were minimized. The docked poses with lower binding energy (Autodock Vina; RMSD, 0.0000) were subjected to molecular dynamics simulations (GROMACS; TIP3P water model; GAFF; 10 ns). 1,25-D₃ *in vivo* prevented insulin resistance, however, cholecalciferol did not reproduce similar effect. 1,25-D₃ *in vivo* decreased serum concentrations of AST and ALT (suggestive of liver protection), LDH and TC and increased TG and total calcium. *In vitro*, 1,25-D₃ stimulated MAPK/ERK1/2 phosphorylation, ⁴⁵Ca²⁺ influx and insulin secretion in rat pancreatic islets. The stimulatory effect of 1,25-D₃ was inhibited by diazoxide, apamine, tapsigargine, dantrolene, 2-APB, nifedipine, TEA, Ro 32-0432, KT-5720; and increased by glibenclamide and N-ethylmaleimide. *In silico*, ERp57 or PKC had favorable energetic interactions with LUM and VDX. Proteins-ligands complexes stability was reflected in the lower variation on RMSD values. LUM or VDX interacted by hydrogen bonds with ERp57 or PKC in a hydrophobic pocket with related surface areas. The stimulatory effect of 1,25-D₃ on pancreatic β cells involves the activation of L-VDCC, K⁺-ATP and K⁺-Ca²⁺ channels, which contributes to cellular depolarization. These ionic changes also activate downstream participant's. After an abrupt intracellular calcium increase and insulin secretion, the activation of K_v channels may be crucial for cell repolarization. *In silico* predictions suggest that LUM and VDX interact with ERp57 and PKC, thus triggering and activating rapid non-genomic responses (MAPK/ERK1/2 pathway), contributing to the pancreatic β cells survival of rats. Altogether, these data point out that the studied proteins are possible therapeutic targets, together with the role of 1,25-D₃ as an adjuvant in hyperglycemia.

Keywords: 1α,25(OH)₂ Vitamin D₃. Calcium. MAPK/ERK 1/2. Pancreatic β cells. Insulin secretion. ERp57. PKC. Molecular Docking. Molecular Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Número de pessoas com diabetes tipo 2 no mundo e por região em 2019, 2030 e 2045 (20–79 anos).	22
FIGURA 2 – Sistemas que controlam a dinâmica subcelular de Ca^{2+} nas células β pancreáticas.	25
FIGURA 3 – Representação esquemática do processo excitatório.	28
FIGURA 4 - Representação esquemática da proteína PKC- α	30
FIGURA 5 – Sinalização da PKC- α	31
FIGURA 6 – Diagrama esquemático da proteína ERp57 (epitélio intestinal de pinto).	34
FIGURA 7 – Vias de ativação e inativação da vitamina D_3	36
FIGURA 8 – Estruturas químicas 2D dos ligantes VDX e LUM.	37
FIGURA 9 – Papel da 1,25- D_3 na homeostase glicêmica e a função nas células β pancreáticas.	40
FIGURA 10 – Perfil de ação da 1,25- D_3 e colecalciferol no teste de tolerância à insulina.	63
FIGURA 11 – Conteúdo de glicogênio hepático de ratos tratados com 1,25- D_3 e colecalciferol.	64
FIGURA 12 – Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas na presença de 1,25- D_3	66
FIGURA 13 – Participação dos canais de potássio no efeito estimulatório da 1,25- D_3 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas.	67
FIGURA 14 – Papel do transporte vesicular e dos microtúbulos no efeito estimulatório da 1,25- D_3 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas.	68
FIGURA 15 – Efeito estimulatório da 1,25- D_3 na secreção de insulina estática.	68
FIGURA 16 – Participação do cálcio extra e intracelular no efeito estimulatório da 1,25- D_3 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas.	69
FIGURA 17 – Participação da PKC e PKA no efeito estimulatório da 1,25- D_3 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas.	70
FIGURA 18 – Efeito da 1,25- D_3 no imunoconteúdo de p-ERK1/2 na presença de PD 98-059 em pâncreas de ratos após tratamento <i>in vitro</i>	70
FIGURA 19 - Zeta-score geral que garante a qualidade dos modelos ERp57 (A) e PKC (B) preditos pela base de dados ProSa-web (proteína modelada).	78

FIGURA 20 – Ligações de hidrogênio e contribuições hidrofóbicas previstas pelas ferramentas A) LigPlot ⁺ e B) PoseView entre ERp57 e LUM.C) Mapa de existência de ligações de hidrogênio previstas na DM entre ERp57 – LUM.....	80
FIGURA 21 – Ligações de hidrogênio e contribuições hidrofóbicas previstas pelas ferramentas A) LigPlot ⁺ e B) PoseView e C) Mapa de existência de ligações de hidrogênio previstas na DM entre ERp57 – VDX.	81
FIGURA 22 – Estrutura 2D representando as interações entre VDR-VDX (entrada PDB: 2ZLC).	83
FIGURA 23 – Variação de RMSD previsto entre ERp57 e os ligantes LUM e VDX.	84
FIGURA 24 – A) Superfícies eletrostática e B) hidrofóbicas previstas por APBS/PDB2QR, para o complexo ERp57 - LUM (frame 3.30 ns).	86
FIGURA 25 – A) Cavidades previstas pela ProteinsPlus e B) Superfícies eletrostática e C) hidrofóbicas previstas por APBS/PDB2QR, para o complexo ERp57 - VDX (frame 5,85 ns)....	87
FIGURA 26 – Energias relacionadas à manutenção dos complexos ERp57 - ligantes previstas pelas simulações de dinâmica molecular.....	88
FIGURA 27 – Contribuição dos resíduos para a energia de ligação entre A) ERp57 - LUM e B) ERp57 - VDX. Dinâmica molecular visual entre C) ERp57 - LUM e D) ERp57 - VDX. Complexos E) ERp57 - LUM e F) ERp57 - VDX previstos na DM.	89
FIGURA 28 – Ligações de hidrogênio e contribuições hidrofóbicas previstas pelas ferramentas A) LigPlot ⁺ e B) PoseView entre PKC e LUM. C) Mapa de existência de ligações de hidrogênio previstas na DM entre PKC – LUM.....	91
FIGURA 29 – Ligações de hidrogênio e contribuições hidrofóbicas previstas pelas ferramentas A) LigPlot ⁺ e B) PoseView entre PKC e VDX. C) Mapa de existência de ligações de hidrogênio previstas na DM entre PKC – VDX.....	92
FIGURA 30 – Variação de RMSD previsto entre PKC e os ligantes LUM e VDX.....	94
FIGURA 31 – Cavidades previstas pela ProteinsPlus entre A) PKC - LUM e B) PKC - VDX. Superfícies eletrostáticas previstas para C) PKC - LUM e D) PKC - VDX e superfícies hidrofóbicas previstas para os complexos E) PKC – LUM (frame 4,45 ns) e PKC - VDX (frame 1,20 ns) por APBS/PDB2QR.	95
FIGURA 32 – Energias relacionadas à manutenção dos complexos PKC - ligantes previstas pelas simulações de dinâmica molecular.....	97
FIGURA 33 – Contribuição dos resíduos para a energia de ligação entre A) PKC - LUM e B) PKC - VDX. Dinâmica molecular visual entre C) PKC - LUM e D) PKC - VDX. Complexos E) PKC - LUM e F) PKC - VDX previstos na DM.	98

FIGURA 34 - Mecanismo de ação proposto para 1,25-D ₃ no influxo de cálcio, nas células β pancreáticas, que desencadeiam a exocitose regulada das vesículas de insulina e a secreção hormonal.....	109
FIGURA 35 – Interações preditas entre os ligantes LUM (1,25-D ₃ conformação 6- <i>s-cis</i>) e VDX (1,25-D ₃ conformação 6- <i>s-trans</i>) e as proteínas ERp57 e PKC que contribuem para a ativação da via de sinalização MAPK/ERK1/2.	110

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Critérios de diagnóstico para a DM.....	20
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Influência da 1,25-D ₃ nas enzimas séricas, CT, TG e cálcio, medidas ao final do teste de tolerância à insulina (40 min).	64
TABELA 2 – Predições ADMET calculadas pelas bases de dados SwissADME and ADMETLab*.....	75
TABELA 3 – Parceiras fisiológicas (interação proteína-proteína) preditas pela STRING.....	76
TABELA 7 – Resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações proteína-ligante preditas para cada frame com o auxílio das ferramentas PoseView, UCSF Chimera e LigPlot ⁺	79
TABELA 8 – Taxas de ocupação de ligações de hidrogênio preditas na DM entre ERp57 - LUM.	81
TABELA 9 – Taxas de ocupação de ligações de hidrogênio preditas na DM entre ERp57 – VDX.	82
TABELA 10 – Cavidades preditas pela Proteins <i>Plus</i> e CavityPlus para as interações proteína-ligante.	86
TABELA 11 – Energias calculadas pelo GROMACS (ΔG SASA) e pelo método MMPBSA para os complexos ERp57 – LUM e ERp57 – VDX.....	88
TABELA 12 – Taxas de ocupação de ligações de hidrogênio preditas na DM entre PKC - LUM.	91
TABELA 13 – Taxas de ocupação de ligações de hidrogênio preditas na DM entre PKC - VDX.	93
TABELA 14 – Cavidades preditas pela Proteins <i>Plus</i> para as interações proteína-ligante.	95
TABELA 15 – Energias calculadas pelo GROMACS (ΔG SASA) e pelo método MMPBSA para os complexos PKC – LUM e PKC – VDX.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM – Micromolar

1,25-D₃ - 1 α -25-diidroxitamina D₃

1,25-D₃-MARRS – Receptor de esteróide de resposta rápida associado à membrana

25-D₃ – 25-hidroxitamina D₃

2-APB – Borato de 2-aminoetoxidifenil

⁴⁵Ca²⁺ - Cálcio radioativo

7-DHC – 7-deidrocolesterol

ADA – Associação Americana de Diabetes

ADMET – absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade

ALT – Alanina aminotransferase

α PKC – Proteína cinase C atípica

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

BAPTA-AM – 1,2 bis (2-aminofenoxi) etano N,N,N',N' Tetraacético ácido tetraquis (éster acetoximetílico)

BSA – Albumina bovina sérica

Ca²⁺ - Cálcio

CAMK2G – Proteína cinase II gama dependente de cálcio / calmodulina

cAMP – Monofosfato de adenosina cíclico

CAV1 – Caveolina 1

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CMD – Cardiomiopatia diabética

cPKC – Proteína cinase C convencional

CT – Colesterol total

CYP – Citocromo P

Da – Daltons (unidade de massa atômica)

DAG – Diacilglicerol

DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DBP – Proteína de ligação da vitamina D₃

DCCT – Teste de controle e complicações da diabetes

DCV – Doença cardiovascular

DM – Dinâmica Molecular

DM – Diabetes Melito
DM1 - Diabetes Melito tipo 1
DM2 – Diabetes Melito tipo 2
DMG – Diabetes Melito gestacional
E.P.M. – Erro padrão da média
EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK – Cinase regulada por sinal extracelular
ERp57 – Receptor de retículo endoplasmático 57
FGF-23 – Fator de crescimento de fibroblasto-23
 γ -GT – Gama-glutamil transpeptidase
GLUT - Transportador de glicose
GSIS – Secreção de insulina estimulada por glicose
H-bond – ligação de hidrogênio
HbA1C – Hemoglobina glicada fração A1C
IDF – Federação Internacional de Diabetes
IL-6 – Interleucina-6
INS-R – Receptor de insulina
IP3 – Inositol trifosfato
IRP – Pool de liberação imediata
TTI – Teste de tolerância à insulina
JNK – Jun N-terminal cinase
 K^+ – Potássio
 K^+ -ATP – Canais de potássio dependentes de ATP
kDa – KiloDaltons (unidade de massa atômica)
KTTI – Constante de decaimento do teste de tolerância à insulina
KRb-HEPES – Tampão Krebs-Ringer bicarbonato
 K_v – Canais de potássio dependentes de voltagem
LDH – Lactato desidrogenase
L-VDCC – Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
LUM – 1,25-D₃ (conformação 6-*s-cis*)
Map2k1 – Proteína cinase cinase 1 ativada por mitógeno de especificidade dupla
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno

MEK – Proteína cinase ativada por mitógeno
mM – Milimolar
MM-PBSA – Método da área de superfície de Poisson-Boltzmann da Mecânica Molecular
*m*VDR – VDR de membrana
NGSP – Programa Nacional para Padronização da Hemoglobina Glicada
nM – Nanomolar
nPKC – Nova Proteína cinase C
NPT – número de partículas, volume e pressão
*n*VDR – VDR nuclear
NVP – número de partículas, volume e temperatura
OGTT – Teste oral de tolerância à glicose
OMS – Organização Mundial da Saúde
oxLDL – Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PBS – Tampão fosfato-salina
PDIA3 – Proteína dissulfeto isomerase família A membro 3
pERK – Cinase fosforilada regulada por sinal extracelular
Pick1 – Proteína de ligação do tipo proteína cinase C alfa
PKA – Proteína cinase A
PKC – Proteína cinase C
PLA2 – Fosfolipase A2
PLAA – Proteína ativadora de fosfolipase A2
PLC – Fosfolipase C
pM – Picomolar
PM – peso molecular
PPAR- δ – Receptor ativado por proliferador de peroxissomo tipo gama
PRKCA – Proteína cinase C tipo alfa
PTH – Paratormônio
Raf – RAF proto-oncogene serina/treonina-proteína cinase
RE – Retículo endoplasmático
RHD – Domínio de homologia Rel de ligação ao DNA
RMSD – Raiz média do desvio quadrático
RRP – Pool de liberação rápida
RXR – Receptor retinóide X
RYR – Receptor de rianodina

SASA – Área de superfície acessível a solvente
SERCA – Bomba Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoendoplasmático
Sdc4 – Sindecin-4
SMILES – Sistema simplificado de entrada de linha de entrada molecular
SNARE – Receptor de proteína de ligação sensível à fusão à N-etilmaleimida
SRP – Pool de liberação lenta
TEA – Tetraetilamônio
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
TG – Triacilglicerol
TPSA – Área de superfície topológica polar
UVB – Ultravioleta B
VDCC – Canais de cálcio dependentes de voltagem
VDR – Receptor da vitamina D
VDRE – Elemento de resposta à vitamina D
VDX – 1,25- D_3 (conformação 6-*s-trans*)
VMD – Dinâmica molecular visual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DIABETES MELITO.....	19
1.1.1	Epidemiologia	21
1.1.2	Diabetes Melito tipo 2	22
1.2	INSULINA	23
1.3	CANAIS IÔNICOS E INFLUXO DE CÁLCIO.....	23
1.3.1	Canais de potássio	26
1.3.2	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCC)	26
1.3.3	Complexo SNARE	27
1.3.4	Receptores de rianodina (RYR), receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e bomba SERCA	28
1.3.5	PKC-α	29
1.3.6	PKA	32
1.3.7	ERp57 / PDIA3 / 1,25-D₃-MARRS	33
1.4	VITAMINA D ₃	34
1.5	associação entre vitamina d ₃ e dm2.....	37
1.6	via de sinalização MAPK/ERK 1/2.....	41
2	HIPÓTESE	44
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo Geral	45
3.2	Objetivos Específicos	45
4	ESQUEMA METODOLÓGICO DO ESTUDO	47
4.1	materiais	50
4.1.1	Químicos	50
4.1.2	Animais	51
4.2	metodologia <i>IN VIVO</i>	51
4.2.1	Tratamento com 1,25-D₃ e teste de tolerância à insulina (TTI)	51

4.2.2	Análises bioquímicas	52
4.2.3	Tratamento com colecalciferol (25-D₃) e teste de tolerância à insulina (TTI)....	53
4.2.4	Determinação do conteúdo de glicogênio hepático.....	53
4.3	METODOLOGIA <i>IN VITRO</i>	54
3.4.1	Isolamento das ilhotas pancreáticas	54
3.4.2	Influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas isoladas.....	54
3.4.3	Secreção induzida de insulina pelas ilhotas pancreáticas.....	55
3.4.4	Análise por Imunofluorescência.....	56
3.4.5	Análises estatísticas	57
4.4	METODOLOGIA <i>IN SILICO</i>	57
4.4.1	Perfil ADMET.....	57
4.4.2	Parceiras fisiológicas das proteínas-alvo.....	57
4.4.3	Estrutura dos ligantes	58
4.4.4	Modelo de homologia e Docking Molecular das proteínas-alvo.....	58
4.4.5	Dinâmica Molecular	59
4.4.6	Análise das cavidades.....	61
5	RESULTADOS.....	62
5.1	TRATAMENTO <i>IN VIVO</i>	62
4.1.2	Efeito da 1,25-D₃ e do colecalciferol na resistência à insulina.....	62
4.1.2	Conteúdo de glicogênio hepático.....	63
4.1.3	Efeito da 1,25-D₃ nas enzimas séricas, colesterol total, triacilglicerol e cálcio ...	64
5.2	TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	65
5.2.1	Mecanismo de ação da 1,25-D₃ associado ao influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos	65
5.2.2	Efeito da 1,25-D₃ no imunocónteúdo da proteína cinase MAPK/ERK1/2 fosforilada (p-erk 1/2) em ilhotas pancreáticas de ratos.....	70
5.3	ESTUDOS <i>IN SILICO</i>.....	72
5.3.1	Predições do perfil ADMET	72

5.3.2	Parceiras fisiológicas	76
5.3.3	Qualidade dos modelos gerados	78
5.3.4	Interações proteína-ligante referentes à Dinâmica Molecular (DM)	78
<i>5.3.4.1</i>	<i>ERp57</i>	<i>79</i>
<i>5.3.4.2</i>	<i>PKC</i>	<i>90</i>
6	DISCUSSÃO	100
7	CONCLUSÕES	108
8	ARTIGO PUBLICADO	111
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	112
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

1 INTRODUÇÃO

A vitamina D compreende um grupo de moléculas lipossolúveis denominadas secosteróides (NORMAN, 2008). A vitamina D₃ pode ser obtida exogenamente (10 a 20%) da dieta ou endogenamente (80 a 90%) através da exposição à luz solar (UVB), pelo 7-desidrocolesterol, um metabólito do colesterol presente na epiderme, que atua como precursor da vitamina D₃, para ser posteriormente absorvido pela corrente sanguínea (NAIR; MASEEH, 2012; NORMAN, 2008).

A vitamina D₃ só possui atividade biológica mediante a um processo de hidroxilação que ocorre em duas etapas (BOUILLON et al., 1995). Primeiramente, ela é metabolizada no fígado pela ação das enzimas do citocromo P450 (CYP2R1 e CYP27A1), onde é então convertida em 25(OH)D₃ (25-D₃), também denominada colecalciferol, a principal forma circulante. A segunda etapa de hidroxilação ocorre nos rins e requer a enzima CYP27B1, para formar o principal metabólito ativo, a 1 α ,25(OH)₂D₃ (1,25-D₃) ou calcitriol, e o metabólito menos ativo, 24R, 25(OH)₂D₃, na qual são transportados sistemicamente para os órgãos-alvo (NORMAN et al., 1993). Várias vias e o metabolismo característico da vitamina D₃, bem como metabólitos análogos e enzimas específicas das vias metabólicas da vitamina D₃ têm sido recentemente associados com a regulação da glicemia e da secreção da insulina pelas células β pancreáticas (BENETTI et al., 2018; CHENG; BOUCHER; LEUNG, 2013; KAJIKAWA et al., 1999; NORMAN et al., 1980). Evidências indicam que existe uma correlação inversa entre as concentrações circulantes de vitamina D₃ e o risco para desenvolvimento de algumas doenças, incluindo diabetes melito tipo 2 (ANDERSON et al., 2010; KNEKT et al., 2008; PITTAS et al., 2010). Além disso, dados de estudos com roedores corroboram a hipótese de que a vitamina D₃ contribui para a saúde das células β e sua deficiência tem efeitos desfavoráveis na secreção de insulina (CHENG; BOUCHER; LEUNG, 2013; KJALARSDOTTIR et al., 2019; NORMAN et al., 1980). A suplementação com vitamina D₃ parece restaurar esse importante evento fisiológico (BORISSOVA et al., 2003; BOUCHER et al., 1995; CADE; NORMAN, 1986; MITRI; PITTAS, 2014) tanto na fase 1 quanto na fase 2 de secreção de insulina (KADOWAKI; NORMAN, 1985). No entanto, o mecanismo de ação pelo qual a vitamina D₃ é capaz de controlar a glicemia ainda é desconhecido.

A diabetes melito (DM) é caracterizada por um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação e/ou secreção de insulina. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e Associação Americana de Diabetes (ADA) a DM pode ser dividida em quatro classes clínicas distintas: DM tipo 1, caracterizado por um processo autoimune que resulta em destruição total das células β , geralmente levando à absoluta deficiência de insulina; DM tipo 2, frequentemente associada à obesidade e resistência periférica à insulina; DM gestacional, caracterizada por qualquer alteração da glicemia durante a gestação, podendo acarretar risco ao desenvolvimento fetal; e outros tipos específicos de DM, que envolvem defeitos genéticos das células pancreáticas ou pancreatites (ADA, 2019; OMS, 2020).

A diabetes melito tipo 2 (DM2) é a forma mais frequente de DM, cuja principal característica é a hiperglicemia resultante da perda da ação da insulina nos tecidos alvo e posteriormente perda progressiva da secreção de insulina pelas células β pancreáticas (HALPERN et al., 2010). Isto se dá, não apenas à redução da massa de células β , mas também por falhas na sinalização de ATP / Ca^{+2} (PEYOT et al., 2010). A hiperglicemia crônica está relacionada a alterações e complicações macrovasculares, incluindo doença cardiovascular, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral; e distúrbios microvasculares, caracterizados por retinopatia, nefropatia e neuropatia (CADE, 2008; NAZIMEK-SIEWNIAK; MOCZULSKI; GRZESZCZAK, 2002).

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células β pancreáticas e atua em tecidos alvos (tecido muscular esquelético e tecido adiposo, principalmente). A partir da interação da insulina com o receptor de insulina na membrana plasmática (INS-R), ocorre autofosforilação do segmento intracelular em resíduos de tirosina. O receptor ativado fosforila vários substratos proteicos (IRS, insulin receptor substrate) e o resultado consiste no acoplamento da ativação do receptor de insulina com vias de sinalização, principalmente PI3K e MAPK, que vão promover efeitos no metabolismo de carboidratos (translocação do receptor GLUT4), lipídios e proteínas; mas também no crescimento e proliferação celular, respectivamente (PETERSEN; SHULMAN, 2018).

A vitamina D₃ desempenha papel essencial na secreção de insulina e estímulo da expressão de INS-R, o que leva a maior capacidade de resposta à insulina na captação de glicose pelos tecidos alvos (MAESTRO et al., 2000). A 1,25-D₃ também possui mecanismo de resposta rápida não genômica que atua direta ou indiretamente no controle das células β e na secreção de insulina. Geralmente, essas respostas são geradas entre 1 a 2 min e 15 a 45 min. Isso contrasta

com as respostas genômicas, que geralmente levam horas ou dias para se tornarem totalmente aparentes, e que podem ser bloqueadas por inibidores de transcrição e tradução (MIZWICKI; NORMAN, 2009).

As ilhotas pancreáticas contêm um alto nível de expressão do receptor da vitamina D₃ (VDR), na qual é responsável pelas principais respostas biológicas geradas pela 1,25-D₃ (HUMMEL et al., 2014). A forma molecular estrutural da 1,25-D₃ é altamente flexível. Assim, os isômeros *6-s-cis* e *6-s-trans* da 1,25-D₃ resultam de uma rotação de 360 graus em torno dos carbonos 5 e 6 a uma taxa de milhões de vezes por segundo (HAUSSLER et al., 2011). O receptor VDR pode se ligar preferencialmente com o isômero *6-s-trans* da 1,25-D₃ e conduzir esta molécula para o núcleo da célula (CHEN et al., 2019). Além disso, estudos prévios identificaram um receptor putativo para a 1,25-D₃ localizado nas caveolas (miristoilado) da membrana plasmática. Este receptor foi denominado 1,25-D₃-MARRS (receptor de esteróide de resposta rápida associado à membrana) ou *mVDR* (VDR de membrana) (NORMAN, 2012). Curiosamente, 1,25-D₃-MARRS foi identificado como idêntico ao receptor de retículo endoplasmático 57/60 (ERp57 ou ERp60) ou à família da Proteína Dissulfeto Isomerase A, membro 3 (PDIA3) (STERLING; KHANAL; NEMERE, 2013). Os estudos de estrutura-função indicam que a interação específica entre o *mVDR* e o ligante 1,25-D₃ ocorre preferencialmente com o isômero *6-s-cis* (NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004). Os efeitos rápidos desencadeados pela ligação da 1,25-D₃ ao *mVDR* podem contribuir para as vias de transdução de sinal a jusante e ativação de segundos mensageiros, como a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína cinase C (PKC) e outras proteínas associadas (HAUSSLER et al., 2011; STERLING; KHANAL; NEMERE, 2013). Além disso, esta interação resulta na transcaltachia (estimulação hormonal rápida do transporte de cálcio), abertura ou regulação dos canais de cálcio ou potássio (K⁺-ATP) para estimular a exocitose e a secreção de insulina pelas células β pancreáticas (HAUSSLER et al., 2011).

O cálcio é o principal regulador intracelular da secreção de insulina, atuando nas células β pancreáticas como gatilho para a exocitose. A glicose entra na célula β pancreática por um transporte facilitado envolvendo o transportador GLUT2 em roedores (em humanos, GLUT1 e GLUT3). Após a fosforilação pela glucocinase, a glicose é metabolizada durante a glicólise no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Em resposta ao aumento da razão ATP / ADP do metabolismo da glicose, ocorre o fechamento dos canais K⁺-ATP e a despolarização da

membrana plasmática. Isso gera abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC), os principais canais de entrada de cálcio nas células β pancreáticas, que leva a alterações pulsáteis do cálcio citosólico (RUTTER et al., 2017). Canais de K^+ dependentes de voltagem (K_v), canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} (K^+-Ca^{2+}) e o trocador Na^+/Ca^{2+} também estão envolvidos no mecanismo de secreção de insulina e desempenham papéis específicos (RUTTER et al., 2017).

O mecanismo da 1,25- D_3 também é descrito pelo seu papel através da via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK/ERK1/2), sendo capaz de gerar respostas teciduais positivas, tais como ação anti-apoptótica, anti-oxidante e anti-inflamatória (EL-MANSI; AL-KAHTANI, 2019; HUANG et al., 2015; LI et al., 2018; XU et al., 2016), podendo assim, influenciar na sobrevivência das células β pancreáticas. Nesse cenário, a 1,25- D_3 também contribui indiretamente para a função das células β pancreáticas, o que pode estar relacionada à interação com ERp57 expresso nesse tecido (YAMAMOTO et al., 2014). De fato, a expressão aumentada de ERp57 tem um papel protetor na homeostase das células β por meio do processo de autofagia modulado por ERp57. Uma vez que este processo é crucial para prevenir disfunções de células β na diabetes mellito tipo 2 (YAMAMOTO et al., 2014).

As respostas fisiológicas após o tratamento com 1,25- D_3 incluem a ativação das vias de sinalização de proteínas. De fato, as interações das redes de proteínas podem explicar eventos bioquímicos e prever associações proteína-proteína. Para isto, é possível usar ferramentas de análise de rede por meio de frameworks (gráficos) e algoritmos disponíveis em bases de dados, incluindo a STRING (SZKLARCZYK et al., 2011). O estudo das parceiras fisiológicas permite compreender funções adicionais da proteína alvo (SZKLARCZYK et al., 2015).

A seleção do alvo molecular na descoberta de fármacos depende, pelo menos, da escolha do foco de ação de um composto previamente caracterizado como potencial agente terapêutico (NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004). Assim, as predições *in silico* podem esclarecer alguns mecanismos moleculares por trás das interações entre a molécula 1,25- D_3 (cis / trans) e o receptor de membrana ERp57, ou a proteína cinase C (PKC). Estas proteínas estão envolvidas na sinalização intracelular rápida das células β pancreáticas, onde as proteínas MAPK/ERK1/2 podem ser moduladas pela 1,25- D_3 . Durante os últimos anos, os avanços no cálculo de energias livres de ligação envolvendo simulações moleculares, têm sido significativos e altamente reconhecidos pelo mundo científico. Além disso, esses cálculos podem contribuir para melhorar a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos (DE RUITER; OOSTENBRINK, 2020).

Diante do cenário atual da diabetes tipo 2 e dos distúrbios que afetam o metabolismo da glicose, juntamente com as inúmeras ações da vitamina D₃ e metabólitos, estudos prévios do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais têm demonstrado o envolvimento da 1,25-D₃ na homeostasia da glicose, como por exemplo, através de vias de sinalização de translocação do GLUT4 no músculo esquelético (GOMES CASTRO et al., 2014). Apoiado em pesquisas anteriores, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos em curto prazo (5 dias) do colecalciferol e da 1,25-D₃ na glicemia de ratos normoglicêmicos e resistentes à insulina, bem como, avaliar o efeito do tratamento com 1,25-D₃ na lesão hepática, toxicidade e influência dos lipídios séricos. Foi ainda objetivo deste trabalho, elucidar as vias de sinalização e os canais iônicos que medeiam a ação deste hormônio nas células β pancreáticas, a fim de estabelecer o possível mecanismo de ação da 1,25-D₃ (resposta rápida) na exocitose regulada das vesículas de insulina, focando em alvos terapêuticos importantes e ainda pouco elucidados. Além disso, estudar o papel da via de sinalização MAPK/ERK1/2 na ação da 1,25-D₃, a fim de elucidar a possível participação desta via no mecanismo de ação da 1,25-D₃ em células β pancreáticas de ratos e prever através de simulações *in silico* a possível interação e as energias envolvidas entre as proteínas ERp57 e PKC com os ligantes isômeros da 1,25-D₃ (6-*s-cis* ou 6-*s-trans*).

1.1 DIABETES MELITO

A diabetes melito (DM) ou diabetes é um distúrbio metabólico heterogêneo caracterizado pela presença de hiperglicemia devido ao comprometimento da secreção de insulina, ação defeituosa da insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica presente na DM está associada a complicações microvasculares de longo prazo, relativamente específicas, e pode afetar os olhos, rins e nervos, bem como um risco aumentado para doença cardiovascular (DCV). Os critérios de diagnóstico para a DM são apoiados em limiares de glicose plasmática em amostras de sangue venoso (ADA. American Diabetes Association, 2020).

A classificação atual da DM se baseia na etiologia e não no tipo de tratamento. De acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA), a diabetes inclui quatro classes:

- **Diabetes tipo 1 (DM1):** resulta principalmente de destruição das células β pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. O indivíduo é propenso a cetoacidose.

- **Diabetes tipo 2 (DM2):** pode variar de resistência à insulina predominante com deficiência relativa de insulina a um defeito secretor predominante com resistência à insulina.
- **Diabetes gestacional (DMG):** refere-se à intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez.
- **Tipos específicos de DM devido a outras causas:** esta categoria engloba síndromes do diabetes monogênico (como o diabetes neonatal e o diabetes da maturidade de início precoce [MODY; *maturity-onset diabetes of the Young*]), doenças do pâncreas exócrino (tais como fibrose cística) e a diabetes induzida por fármacos ou substâncias químicas (tais como a utilização de glicocorticóides no tratamento do HIV/AIDS ou após transplante de órgãos) (ADA. American Diabetes Association, 2020).

Os critérios de diagnóstico para diabetes estão resumidos no Quadro 1.

QUADRO 1 – Critérios de diagnóstico para a DM.

<p>Glicose de jejum ≥ 126 mg / dL</p> <p>(Jejum = sem ingestão calórica por pelo menos 8 h)</p> <p>Ou</p> <p>HbA1c $\geq 6,5$ %</p> <p>(O teste deve ser realizado em laboratório, usando um método que seja certificado pelo NGSP e padronizado para o ensaio DCCT).*</p> <p>Ou</p> <p>Glicemia pós 2 h 75 g OGTT ≥ 200 mg / dL</p> <p>O teste deve ser realizado conforme descrito pela OMS, usando uma carga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvido em água. *</p> <p>Ou</p> <p>Glicemia aleatória ≥ 200 mg / dL</p> <p>Em um paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica.</p>

HbA1c, Hemoglobina glicada fração A1c; NGSP, Programa Nacional para Padronização da Hemoglobina Glicada; DCCT, Controle de Diabetes e Complicações; OGTT, Teste oral de tolerância a glicose; OMS, Organização Mundial da Saúde. *Na falta de hiperglicemia inequívoca, o diagnóstico requer dois resultados anormais da mesma amostra ou testes em duas amostras separadas. Fonte: ADA, 2020.

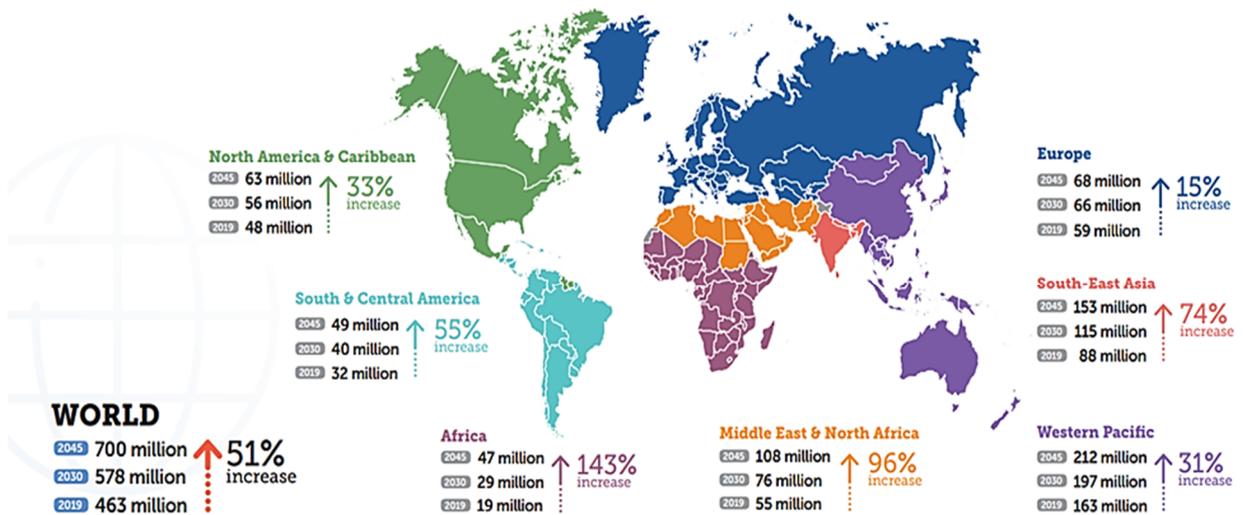
1.1.1 Epidemiologia

A DM2 é considerada uma epidemia crescente e se tornou uma das principais causas de morte no mundo. A prevalência de DM2 aumentou consideravelmente nas últimas décadas e variou entre as comunidades, mostrando que depende da interação entre suscetibilidade genética e certos fatores ambientais. Aproximadamente 463 milhões de adultos com idades entre 20 e 79 anos atualmente vivem com diabetes. Isto representa 9,3% da população do mundo nessa faixa etária (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). O envelhecimento populacional, a crescente prevalência de obesidade, estilo de vida sedentário e urbanização são considerados os principais fatores para o aumento da incidência e prevalência de DM2 em todo o mundo (INGELFINGER; JARCHO, 2017). Estimativas globais prevêm que o número total de adultos com DM2 suba para 578 milhões até 2030 e para 700 milhões até 2045 (Figura 1). Da mesma forma, a prevalência aumentará de 10,2% para 10,9% no mesmo período (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Esse cenário representa um alto custo social e financeiro aos pacientes e ao sistema de saúde, sendo que a doença também está associada a complicações como insuficiência renal, amputação de membros inferiores, cegueira, doença cardiovascular, entre outros (PAPATHEODOROU et al., 2018). Isto representa um total de 4,2 milhões de mortes causadas pela doença somente em 2019 e gastos que atingiram USD 760,3 bilhões com saúde pública (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

O Brasil não é exceção a esse respeito. Atualmente ele é o quinto país líder em termos de número absoluto de pessoas com diabetes tipo 2, correspondendo a 16,8 milhões de adultos com a doença, o que representa 8% da população nacional. No país, entre 2006 e 2016, segundo o Ministério da Saúde, houve um aumento de 60% no diagnóstico da doença, e os custos devem dobrar até 2030, chegando a US\$ 97 bilhões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A projeção para 2045 é que este número aumente para 26 milhões de casos da doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). A diabetes e a doença renal crônica (causada pela diabetes), bem como a glicemia de jejum elevada, constituem atualmente um grande e crescente problema de saúde pública no Brasil (DUNCAN et al., 2017), sendo que 6,6% dos adultos apresentam hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$ (MALTA et al., 2019) e o desafio recai pela falta de controle glicêmico dos pacientes: 50% das pessoas com diabetes tipo 2 desconhecem o

diagnóstico. Surpreendentemente, as ações até o momento para a prevenção e controle são lentas, considerando a magnitude do problema.

FIGURA 1 – Número de pessoas com diabetes tipo 2 no mundo e por região em 2019, 2030 e 2045 (20–79 anos).



Fonte: (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

1.1.2 Diabetes Melito tipo 2

A diabetes melito tipo 2 (DM2) corresponde a 90% - 95% dos casos de diabetes no mundo e a maioria dos pacientes apresentam sobrepeso ou obesidade. O excesso de peso em si causa resistência à insulina. Pacientes que não tem obesidade ou excesso de peso podem apresentar a doença pelo aumento da porcentagem de gordura corporal distribuída, predominantemente na região abdominal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018).

Na DM2, o estado hiperglicêmico é resultante da incapacidade das células dos tecidos alvo responderem totalmente à ação da insulina, uma situação denominada "resistência à insulina". Durante o estado de resistência, o hormônio insulina se torna ineficaz ao longo do tempo, e com isso, as células β pancreáticas são requisitadas a aumentar a produção de insulina na tentativa de manter a demanda hormonal. Com o tempo, a inadequada síntese e ação da insulina pode resultar em sobrecarga seguido de falha irreversível nas células β pancreáticas

(SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018). A DM2 é mais prevalente em idosos, mas tem acometido cada vez mais crianças e adultos jovens, devido ao aumento da incidência de obesidade, inatividade física e dieta inadequada (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

O pilar do tratamento e prevenção da DM2 é a promoção de um estilo de vida saudável, que inclua dieta balanceada, atividade física regular, ausência de tabagismo e manutenção de um peso corporal saudável. Se isto não for suficiente para o controle da glicemia, o tratamento com medicamento via oral é indicado, e a metformina geralmente é o medicamento de primeira linha. Nos casos em que o tratamento com um único hipoglicemiante oral não seja suficiente, algumas opções para terapia combinada são disponibilizadas (sulfonilureias, inibidores da dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), análogos do peptídeo 1 do tipo glucagon (GLP-1). Com a progressão da doença, os medicamentos orais deixam de ser efetivos em controlar a hiperglicemia, passando a serem necessárias aplicações de insulina injetável (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

1.2 INSULINA

A insulina é um polipeptídeo de peso molecular de 5800 Da, secretado pelas células β pancreáticas e desempenha importantes funções na regulação do metabolismo, sendo também um hormônio anabólico. Promove a captação de glicose pelas células e aumenta a síntese de glicogênio, ácidos graxos e proteínas, tendo papel fundamental na conversão do excesso de glicose em duas formas de armazenamento, glicogênio e triacilgliceróis, além de contribuir para a manutenção da homeostase da glicose (RAMESAN; SHARMA, 2009).

1.3 CANAIS IÔNICOS E INFLUXO DE CÁLCIO

Dando destaque a algumas vias de sinalização centrais para a homeostasia da glicose, a que envolve a exocitose das vesículas de insulina nas células β pancreáticas merece menção. A literatura reporta a importância, não só da concentração de glicose, mas também das alterações

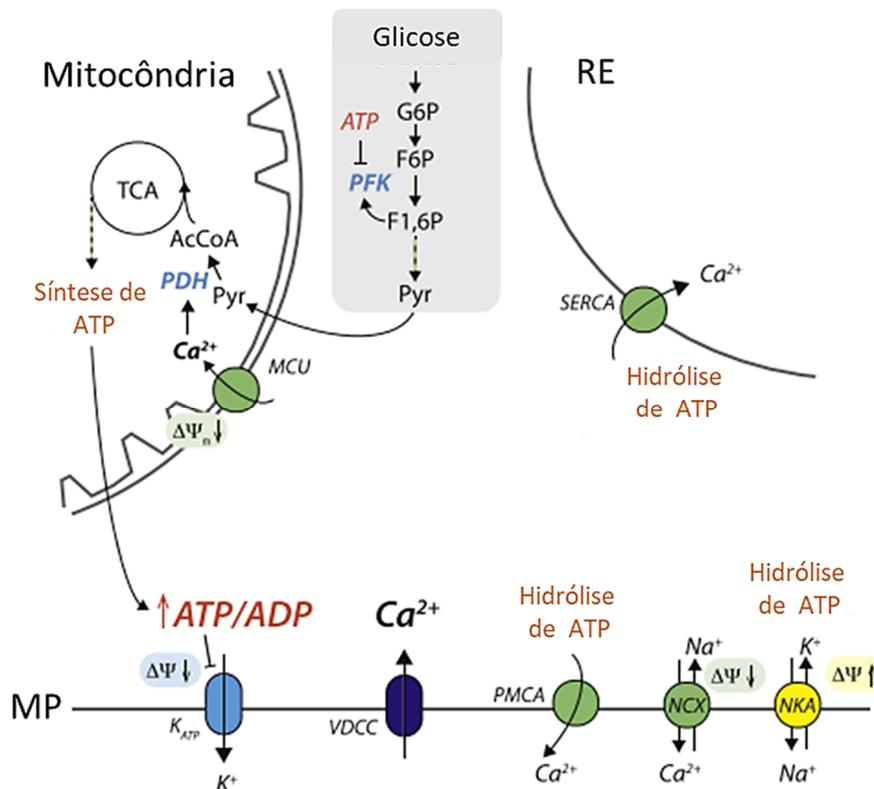
na concentração de cálcio interno das células β pancreáticas, para a liberação de grânulos de insulina (RORSMAN; RENSTRÖM, 2003). O grau de variabilidade do cálcio intracelular é determinante para a liberação das vesículas de *pool* prontamente liberável (RRP), de liberação imediata (IRP) e de liberação lenta (SRP) em células secretórias, como as células β pancreáticas, cromafínicas e melanostróficas (MEARS, 2004; RORSMAN; RENSTRÖM, 2003; SEDEJ; ROSE; RUPNIK, 2005; VOETS, 2000; VOETS; NEHER; MOSER, 1999), isto contribui para a separação das fases cinéticas da exocitose regulada (DOLENŠEK; SKELIN; RUPNIK, 2011).

O íon Ca^{2+} é crítico para a cinética pulsátil de secreção de insulina das células β (GRODSKY; BENNETT, 1966). Qualquer estímulo que induza o influxo de Ca^{2+} na célula β pode desencadear a secreção de insulina, no entanto, a glicose é o secretagogo mais potente em relação a outros estímulos despolarizantes. As células β pancreáticas são bem adaptadas em traduzir alterações na concentração de glicose citoplasmática capazes de gerar alterações na secreção de insulina. A glicose entra na célula β pancreática via transportador GLUT1 ou GLUT2 por difusão facilitada e o efeito estimulatório depende criticamente de um aumento na razão ATP / ADP resultante do metabolismo na via glicolítica (HENQUIN, 2009; PRENTKI; MATSCHINSKY; MADIRAJU, 2013). A regulação de Ca^{2+} ocorre através do metabolismo mitocondrial, onde o piruvato, resultante do metabolismo da glicose via glicólise, é transportado para dentro das mitocôndrias e convertido em acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH), que então entra no ciclo de tricarboxilato (TCA). A entrada de cálcio nas mitocôndrias é facilitada pelo processo mitocondrial uniporte de cálcio (MCU) que acelera o movimento do substrato através do ciclo TCA (RUTTER et al., 2017). Na mitocôndria, o NADH conduz complexos da cadeia respiratória para gerar um gradiente de H^+ e hiperpolarização do potencial de membrana. A dissipação do gradiente de H^+ estimula subsequentemente a produção de ATP pela ATP sintase, cuja atividade também é aumentada por Ca^{2+} . ATP é transportado para fora da matriz mitocondrial via adenina nucleotídeo translocase (ANT), que também é estimulada por um aumento no Ca^{2+} mitocondrial (RUTTER et al., 2017).

O aumento da proporção intracelular de ATP / ADP conduz ao fechamento dos canais de K^+ dependentes de ATP (K^+ -ATP) e diminuição da polarização de membrana que resulta na ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VDCC). Aumentos no $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmático induzidos por glicose, resultantes do influxo do íon através de VDCC ou outros canais de membrana plasmática, ou pela mobilização do íon, desencadeada por receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e receptores de rianodina (RYR), dos estoques do retículo endoplasmático (RE), levam à ativação de várias proteínas efetoras de ligação ao Ca^{2+} , que

direta ou indiretamente impactam as funções celulares de maneiras altamente específicas. A aceleração do metabolismo da glicose estimula a atividade de Ca^{2+} -ATPases localizadas na membrana plasmática (PMCA) e no retículo sarcoendoplasmático (SERCA). O retículo endoplasmático (RE) serve então como um reservatório de Ca^{2+} . As mitocôndrias captam o Ca^{2+} através do processo mitocondrial uniporte de cálcio (MCU) e o libera através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) presente na membrana plasmática (IDEVALL-HAGREN; TENGHOLM, 2020).

FIGURA 2 – Sistemas que controlam a dinâmica subcelular de Ca^{2+} nas células β pancreáticas.



O metabolismo da glicose via glicólise (área sombreada cinza) gera piruvato (pyr), que entra na mitocôndria para promover a síntese de ATP. O aumento da relação ATP / ADP leva ao fechamento dos canais de K^+ -ATP, despolarização da membrana plasmática (PM) ($\Delta\Psi \downarrow$) e abertura dos VDCC. As oscilações na glicólise governadas pelo retorno positivo da frutose-1,6-bisfosfato (F1,6P) sobre a fosfofrutocinase (PFK) podem, assim, conduzir oscilações no $[\text{ATP}]$ citoplasmático e $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmático. Para observar oscilações antifásicas de $[\text{ATP}]$ citoplasmático e $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmático, deve-se assumir que a captação de Ca^{2+} na matriz mitocondrial via complexo mitocondrial uniporte (MCU) acelera a atividade da piruvato desidrogenase (PDH), de modo que a última parte da glicólise seja privada de substrato, incluindo F1,6P crítico para a atividade da PFK. Atividade reduzida de PFK portanto, irá diminuir o fluxo e, assim, a produção de ATP quando o $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmático estiver alto. Outro cenário prevê que as oscilações são impulsionadas pelo aumento do consumo de ATP por enzimas transportadoras de Ca^{2+} . Ca^{2+} -ATPases da membrana plasmática e ER (PMCA e SERCA) hidrolisam o ATP e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) utiliza o gradiente Na^+ que, por sua vez, depende da atividade do ATP-hidrolisando pela Na^+/K^+ -ATPase (NKA). Estes últimos transportadores são eletrogênicos e influenciam o potencial de membrana, conforme indicado. O ATP/ADP reduzido pode reativar os canais de K^+ -ATP e interromper o influxo de Ca^{2+} .

Este cenário pode explicar oscilações antifásicas do $[Ca^{2+}]$ e $[ATP]$ citoplasmático. Quando os canais de K^+ -ATP estão fechados, variações na pequena corrente de NKA podem ser suficientes para oscilações no potencial de membrana e no $[Ca^{2+}]$ citoplasmático. MP: membrana plasmática, RE: retículo endoplasmático. Fonte: Adaptado de (IDEVALL-HAGREN; TENGHOLM, 2020).

1.3.1 Canais de potássio

O papel dos canais de K^+ -ATP no controle da secreção de insulina pela glicose é bem conhecido. O fechamento desses canais estimula a secreção de insulina, mesmo na presença de uma concentração não estimulatória de glicose (RUTTER et al., 2017). No entanto, existe um segundo mecanismo pelo qual a glicose induz a liberação de insulina, na qual, requer um aumento do $[Ca^{2+}]$ citoplasmático e envolve uma amplificação por glicose da eficácia do Ca^{2+} citoplasmático na translocação de grânulos de insulina e/ou exocitose (GILON et al., 2014). Mesmo que os canais de K^+ -ATP sejam centrais para o acoplamento do metabolismo da glicose à atividade elétrica nas células β , eles não são indispensáveis para a geração de oscilações de $[Ca^{2+}]$ citoplasmático (IDEVALL-HAGREN; TENGHOLM, 2020). Entretanto, o fechamento destes canais, na presença de glicose, leva à despolarização rápida da membrana plasmática nas células β pancreáticas. Assim, a corrente externa resultante de K^+ restabelece o potencial de membrana, repolarizando a célula através da abertura dos canais $Kv2.1$., que controlam a duração da despolarização e a secreção de insulina (RORSMAN; ASHCROFT, 2018). Os canais $Kv2.1$ são bloqueados pelo bloqueador de canal de K^+ de amplo espectro (TEA).

Já os canais de potássio de baixa condutância são modulados pelo aumento de Ca^{2+} livre no citosol da célula (K^+ - Ca^{2+}). Embora não sejam canais controlados por tensão, os canais K^+ - Ca^{2+} estão intimamente ligados à atividade elétrica das células β e contribuem para a regulação da duração dos potenciais de ação induzidos pela glicose e repolarização celular (RORSMAN; ASHCROFT, 2018).

1.3.2 Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCC)

O aumento abrupto da concentração de Ca^{2+} citosólico é crucial para desencadear a primeira e segunda fases de liberação de insulina. Esse processo é quase inteiramente devido ao influxo de Ca^{2+} extracelular e o envolvimento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , que

contribuem para a cinética pulsátil de secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) (GILON et al., 2014).

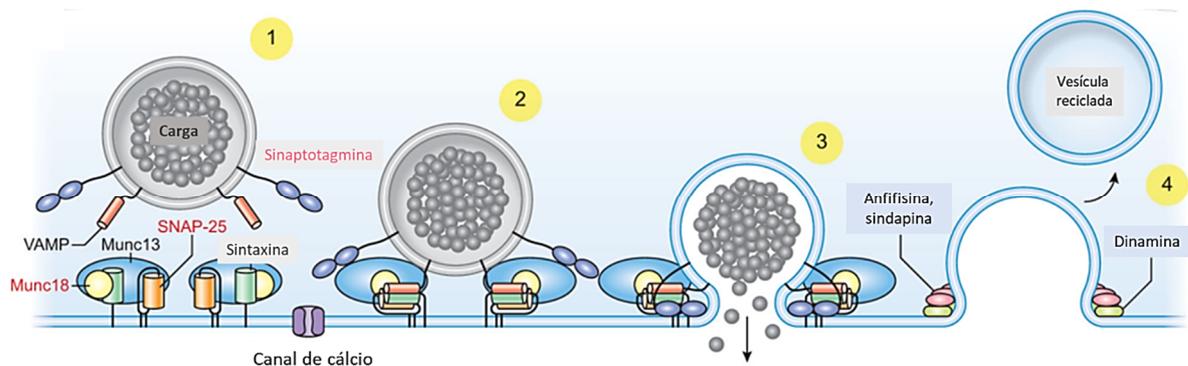
Vários tipos de VDCC são expressos nas células β pancreáticas, incluindo os canais do tipo T, L, P / Q e R. Os canais do tipo L (L-VDCC) predominam em células β de roedores e humanos, mas os outros tipos podem contribuir durante diferentes fases do processo de secreção de insulina (RORSMAN; ASHCROFT, 2018). Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCC) são os principais condutores para a entrada extracelular de Ca^{2+} . Sua abertura desempenha um papel crítico na elevação do potencial de ação das células, e o bloqueio leva à inibição do disparo do potencial de ação e da secreção de insulina (RORSMAN; ASHCROFT, 2018). Além disso, os L-VDCC podem ser regulados por fosforilação proteica, podendo ser ativados por proteínas cinases A (PKA) ou por proteínas cinases C (PKC) (RORSMAN; ASHCROFT, 2018).

1.3.3 Complexo SNARE

O aumento abrupto e constante da concentração de glicose no sangue, *in vitro* ou *in vivo*, resulta na liberação bifásica de insulina. A primeira fase, induzida por cálcio, é atribuída à exocitose rápida e proeminente de um pequeno pool de grânulos de insulina prontamente liberáveis; e a segunda fase é de liberação mais lenta e sustentada, que requer recrutamento e mobilização de grânulos de reserva para reabastecer o *pool* liberável perto dos locais exocitóticos (HENQUIN et al., 2015; PEDERSEN; TAGLIAVINI; HENQUIN, 2019). Essa exocitose regulada compreende um processo complexo com vários estágios, no qual é alcançado quando as vesículas secretórias de insulina são sinalizadas a se fundirem à membrana plasmática em virtude de um aumento de cálcio citosólico (DOLENŠEK; SKELIN; RUPNIK, 2011). Esse evento é mediado especialmente por um conjunto de proteínas da membrana, conhecido como SNAREs, que atuam direcionando o transporte de grânulos de insulina das reservas biossintéticas do citosol às regiões exocitóticas da célula β . Além disso, as vesículas contendo grânulos de insulina são acopladas e ativadas (dependentes de ATP), dessa forma se fundem com a membrana plasmática e liberam os grânulos (EASOM, 2000).

O componente central do aparato de fusão das vesículas consiste no receptor de proteína de ligação (SNARE) sensível à fusão à N-etilmaleimida (NSF) solúvel em membrana plasmática (LITTLETON et al., 2001). NSF hidrolisa o ATP (NSF ATPase) e desmonta os complexos SNARE após o acoplamento e a fusão de vesículas secretoras na membrana plasmática (LITTLETON et al., 2001; ROBINSON; MARTIN, 1998). Nesse contexto, o papel crítico do cálcio citosólico na secreção de insulina foi relatado, facilitando o complexo SNARE nas etapas de maturação das vesículas secretórias, que antecedem à fusão com a membrana plasmática (VOETS, 2000) e aprimorando a mobilização dos grânulos de insulina oriundos dos reservatórios intracelulares (DOLENŠEK; SKELIN; RUPNIK, 2011).

FIGURA 3 – Representação esquemática do processo excitotico.



Os principais componentes moleculares da maquinaria excitotica são mostrados em cada estágio da cascata excitotica. 1) Translocação de vesículas contendo insulina para a membrana plasmática. 2) Docking e priming envolve a formação do complexo trans-SNARE junto com co-fatores como munc13, munc18 e sinaptotagmina. 3) A fusão das vesículas ocorre de maneira dependente de influxo de cálcio, permitindo a liberação de insulina. 4) A reciclagem das vesículas pode ocorrer no momento que antecede a excitose, onde a dinamina e outras proteínas endocitóticas fecham o poro de fusão para recapturar a vesícula da membrana plasmática. Isso pode ocorrer sem a liberação total da carga insulínica para modular a quantidade de carga liberada em cada evento excitotico.

Fonte: Adaptado de (TREXLER; TARASKA, 2017).

1.3.4 Receptores de rianodina (RYR), receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e bomba SERCA

Os receptores de rianodina (RyRs) são canais de liberação de cálcio intracelular necessários para a função de muitos órgãos, incluindo coração e músculo esquelético, transmissão sináptica no cérebro, função das células beta pancreáticas e tônus vascular. Os RyRs medeiam a liberação rápida de Ca²⁺ do retículo endoplasmático / sarcoplasmático (RE / RS) para estimular as funções celulares por meio de processos dependentes de Ca²⁺ (ZALK et

al., 2015). O estresse (sobrecarga hiperadrenérgica e / ou oxidativa) ou mutações genéticas podem comprometer o correto funcionamento destes canais e promover sinais defeituosos que culminam em quadros patológicos como a diabetes melito. De fato, os RyRs têm papel crucial no balanço de Ca^{2+} intracelular que reflete na regulação da secreção de insulina e homeostasia da glicose (SANTULLI et al., 2015).

Outra importante proteína que regula os estoques de cálcio intracelulares nos retículos é o receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3R). O inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) é um mensageiro secundário produzido em resposta a estímulos extracelulares (incluindo hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores) que induz a liberação de Ca^{2+} do RE para o citosol (MIKOSHIBA, 2015). A atividade do IP_3R é regulada por fosforilação (via proteína cinase dependente de Ca^{2+} / calmodulina II e proteína cinase dependente de cGMP), sugerindo que IP_3R faz uma conexão entre a sinalização de Ca^{2+} e fosforilação.

O retículo sarcoplasmático (RS) é uma rede intracelular membranosa encontrada nas células musculares. Embora seja análogo ao retículo endoplasmático (RE), pode armazenar quantidades milimolares de cálcio. Na fase inicial da contração muscular há liberação de cálcio através dos receptores de rianodina (RyR) para o citosol e o RS facilita o relaxamento muscular pela recaptação ativa de cálcio pelo retículo sarcoendoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA). A bomba SERCA é uma proteína transmembranar localizada no RE e RS, responsável pela entrada, saída e armazenamento do Ca^{2+} intracelular. Este balanço acontece de maneira que dois íons Ca^{2+} são transportados para cada molécula de ATP hidrolisada (PERIASAMY; KALYANASUNDARAM, 2007). Ademais, a bomba SERCA tem importante papel na homeostasia da glicose, uma vez que é responsável por manter altas concentrações de cálcio no retículo. De fato, o estresse de retículo está associado a diminuição da expressão da bomba SERCA e consequentemente a secreção de insulina prejudicada (GUSTAVO VAZQUEZ-JIMENEZ et al., 2016).

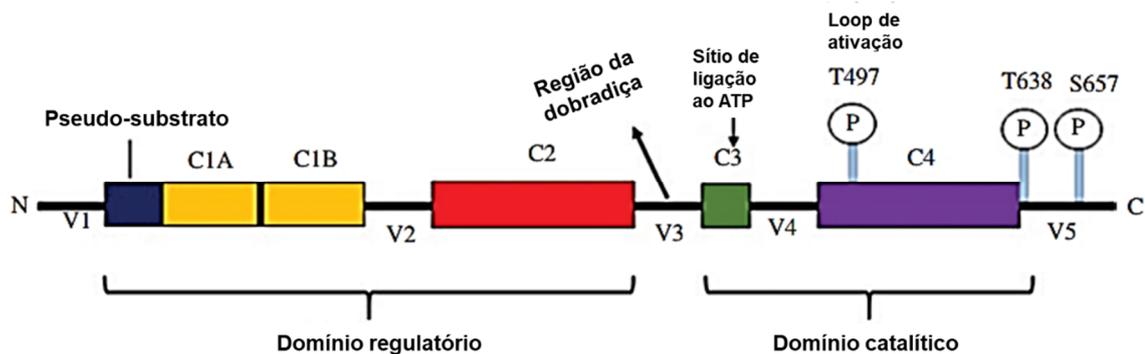
1.3.5 PKC- α

Proteína de 76,8 kD, pertencente à família de enzimas serinas / treoninas cinases envolvida em uma ampla gama de funções celulares (IGUMENOVA, 2015; SINGH et al.,

2017). As PKCs são classificadas de acordo com sua estrutura de domínio regulatório N-terminal e regulação de cofator. Para tanto, estão divididas em três subfamílias: PKCs convencionais ou clássicas (cPKCs) que compreendem as isoformas α , β I, β II e γ ; Novas PKCs (nPKCs) compreendem as isoformas δ , θ , ϵ , η e PKCs atípicos (aPKCs), compreendem as isoformas ζ , λ / ι (TURBAN; HAJDUCH, 2011).

A família das PKCs convencionais compreende um domínio C1 (C1A e C1B) com dois dedos de zinco ricos em cisteína, que funcionam como sítio de ligação para o diacilglicerol (DAG) e o forbol 12-miristato 13- acetato (PMA) e um domínio C2 que funciona como módulos de ligação à membrana dependentes de Ca^{2+} . O domínio regulatório consiste em um domínio C1 e um domínio C2, que conferem sensibilidade aos segundos mensageiros DAG e Ca^{2+} , respectivamente, levando à ativação da cinase (SINGH et al., 2017).

FIGURA 4 - Representação esquemática da proteína PKC- α .



Composição da proteína PKC- α com quatro domínios conservados e cinco domínios variáveis. Os domínios conservados são: C1 (amarelo) responsável pela ligação de DAG, C2 (vermelho) domínio de coordenação de Ca^{2+} . A PKC- α compreende domínios catalíticos conservados C3 (verde) e C4 (roxo) reconhecidos como sítios de ligação ao ATP e ao substrato, respectivamente, e ao pseudo-substrato (azul) que mantém o PKC- α em uma conformação inativa. V3 atua como uma região de dobradiça que conecta o domínio regulatório ao domínio catalítico e hidrolisa proteoliticamente durante a apoptose por caspases.

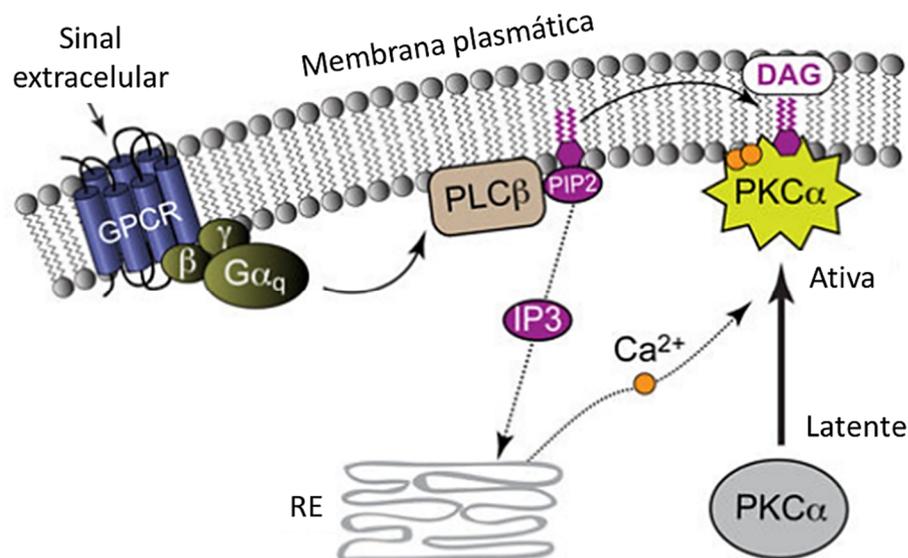
Fonte: Adaptado de (SINGH et al., 2017).

A ativação da PKC- α é mediada por uma série de eventos de fosforilação fortemente acoplados, recrutamento de cofator e ligação com proteínas de ancoragem. A PKC- α é primeiramente fosforilada no resíduo de treonina-497. A fosforilação neste sítio de ativação desencadeia autofosforilação adicional em Thr⁶³⁸ e Ser⁶⁵⁷ no sítio hidrofóbico C-terminal. A fosforilação em Thr⁴⁹⁷ na alça de ativação é necessária para a ativação completa da PKC- α . É importante destacar que na ausência de fosforilação neste local, PKC- α é incapaz de desencadear sinalização intracelular (IGUMENOVA, 2015).

Após a ativação por vários estímulos, a PKC se transloca do citosol para a membrana plasmática e outras organelas celulares, onde sofre uma mudança conformacional, expõe o domínio do pseudo-substrato autoinibitório e ativa a fosforilação de seus substratos. Este evento possibilita que a PKC- α interaja com múltiplas proteínas situadas nos compartimentos celulares e resulta em respostas biológicas variadas. Desta maneira, a PKC- α tem papel importante em várias funções celulares como apoptose, tumorigenicidade, adesão, diferenciação, proliferação e migração celular (LIEN et al., 2021). Além disso, a PKC- α está implicada na regulação de canais iônicos, como os canais de cálcio dependentes de voltagem, que desempenham papel crucial para a secreção de insulina (TREXLER; TARASKA, 2017). A PKC pode ainda contribuir para a secreção de insulina fosforilando proteínas que compõe a maquinaria do complexo SNARE (SNYDER; KELLY; WOODBURY, 2006), ou até mesmo aumentando a ancoragem das vesículas de insulina através da modificação de proteínas envolvidas neste processo, com o objetivo de aumentar o tamanho do volume de vesículas exocitóticas (GILLIS; MÖSSNER; NEHER, 1996).

A PKC- α também tem sido relacionada a algumas doenças metabólicas, incluindo a diabetes. De fato, ela possui um papel importante no controle fisiopatológico da doença, além de inibir a progressão de aterosclerose associada a hiperglicemia crônica (LIEN et al., 2021).

FIGURA 5 – Sinalização da PKC- α .



A PKC- α está localizada no citoplasma na forma latente devido à presença de um segmento de pseudo-substrato autoinibitório na região N-terminal, que ocupa o sítio ativo dentro do domínio catalítico tornando-o incapaz de se

ligar e fosforilar o substrato. Após a ativação de um receptor específico dentro da célula, a fosfolipase C (PLC) cliva o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) em DAG e o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), um mobilizador de Ca²⁺ do retículo endoplasmático. O Ca²⁺ se liga ao domínio C2 da PKC- α e aumenta sua afinidade pela membrana plasmática. No entanto, uma vez que a PKC- α é recrutada para a membrana, ela se difunde dentro do plano da bicamada lipídica e medeia a interação do domínio C1A secundário com DAG que serve como uma âncora para recrutar a PKC- α para a membrana plasmática com alta afinidade, onde se liga com fosfatidilserina, encontrada exclusivamente na superfície citoplasmática. Assim, a ligação do cofator permite que PKC- α se ligue à membrana plasmática e introduza uma mudança conformacional que facilita a separação de um domínio de substrato autoinibitório do local de ligação do substrato, levando à ativação da PKC- α .

Fonte: Adaptado de (IGUMENOVA, 2015).

1.3.6 PKA

PKA (proteína cinase dependente de cAMP) é uma enzima em forma de tetrâmero que consiste em duas subunidades regulatórias e duas subunidades catalíticas. Em mamíferos, existem quatro tipos de subunidades regulatórias, denominadas de RI α , RI β , RII α e RII β . De acordo com as diferentes subunidades regulatórias, a PKA pode ser classificada em PKA tipo I (RI α 2C2, RI β 2C2) e PKA tipo II (RII α 2C2, RII β 2C2) (JOHNSON et al., 2001).

Além de regular vários processos biológicos sob estímulos extracelulares, o mensageiro secundário intracelular cAMP (monofosfato de adenosina cíclico) é o elemento responsável pela ativação da PKA. A ligação de cAMP a duas subunidades regulatórias da PKA (ainda inativa), resulta na liberação e ativação das subunidades catalíticas, seguido de fosforilação em resíduos de serina e treonina de proteínas substrato. A PKA também difere quanto à localização. PKA tipo I são geralmente citoplasmáticas, enquanto PKA tipo II são especificamente ancoradas em estruturas subcelulares e compartimentos. As proteínas PKA ancoradas (AKAPs) podem se ligar a proteínas ou organelas do citoesqueleto e a subunidades regulatórias da PKA, desempenhando assim um papel importante na distribuição nas células (JOHNSON et al., 2001).

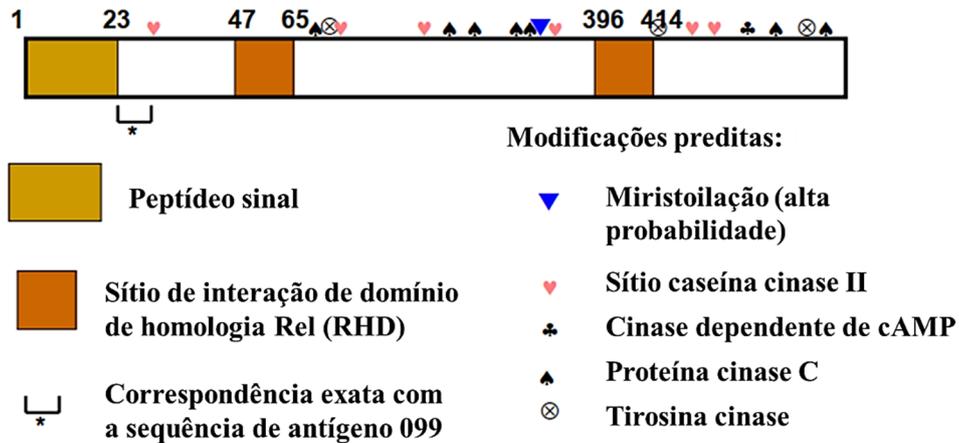
A fosforilação dos canais de cálcio do tipo L (L-VDCC) por PKA é bem caracterizado (FU et al., 2014). Além disso, a via de sinalização da PKA está envolvida na modulação da corrente de cálcio do tipo L induzida pela 1,25-D₃, caracterizando o efeito rápido não genômico deste hormônio (DELGADO et al., 2017a) e contribuindo para a exocitose de grânulos de insulina. Além de facilitar o influxo de Ca²⁺ nas células β pancreáticas, a PKA também desempenha papel importante no estímulo da mobilização e recrutamento de vesículas de insulina em direção à membrana plasmática (MENDES et al., 2018).

1.3.7 ERp57 / PDIA3 / 1,25-D₃-MARRS

A proteína associada à membrana mais bem descrita que se liga a 1,25-D₃ é a enzima PDIA3 (proteína dissulfeto isomerase membro da família A3). Esta proteína é expressa na superfície celular e também é conhecida como ERp57 (receptor de retículo endoplasmático 57), 1,25-D₃-MARRS (resposta rápida associada à membrana ao esteróide) ou *mVDR* (VDR de membrana) (NORMAN, 2012; YANG et al., 2017). Este receptor está localizado nas caveolas da membrana plasmática, associado à caveolina 1 (CAV1) e é responsável por mediar as ações não genômicas rápidas da 1,25-D₃ (ZMIJEWSKI; CARLBERG, 2020).

A proteína de 58 kDa (UniprotKB; P11598; PDIA3_RAT) é caracterizada por apresentar múltiplos domínios com atividade tiorredoxina, responsáveis por mediar processos de oxirredução. Sua atividade é classicamente conhecida no retículo endoplasmático, principalmente por atuar como chaperona e contribuir para o correto dobramento e controle de qualidade de proteínas recém-sintetizadas. Entretanto, a ERp57 está presente em muitos outros compartimentos subcelulares (citossol, mitocôndria, núcleo), o que torna seu papel em processos biológicos muito mais abrangente (TURANO et al., 2011). Além disso, este receptor contribui para os sistemas de transdução de sinais intracelulares oriundos da superfície celular (CHEN et al., 2013). Na membrana plasmática a ERp57 atua mediando cascatas de sinalização dependentes de 1,25-D₃, incluindo a ativação de PLAA (proteína ativadora de fosfolipase A2), PLA2 (fosfolipase A2), PLC (fosfolipase C) e abertura de canais de cálcio. Isso resulta no rápido acúmulo de mensageiros secundários, incluindo DAG (diacilglicerol), IP3 (inositol trifosfato), cAMP e Ca⁺², seguido por ativação de PKC ou CAMK2G (proteína cinase II gama dependente de cálcio / calmodulina) e a alteração de vários alvos a jusante, incluindo vias da MAPK (ZMIJEWSKI; CARLBERG, 2020)

FIGURA 6 – Diagrama esquemático da proteína ERp57 (epitélio intestinal de pinto).



Fonte: Adaptado de (NEMERE et al., 2004).

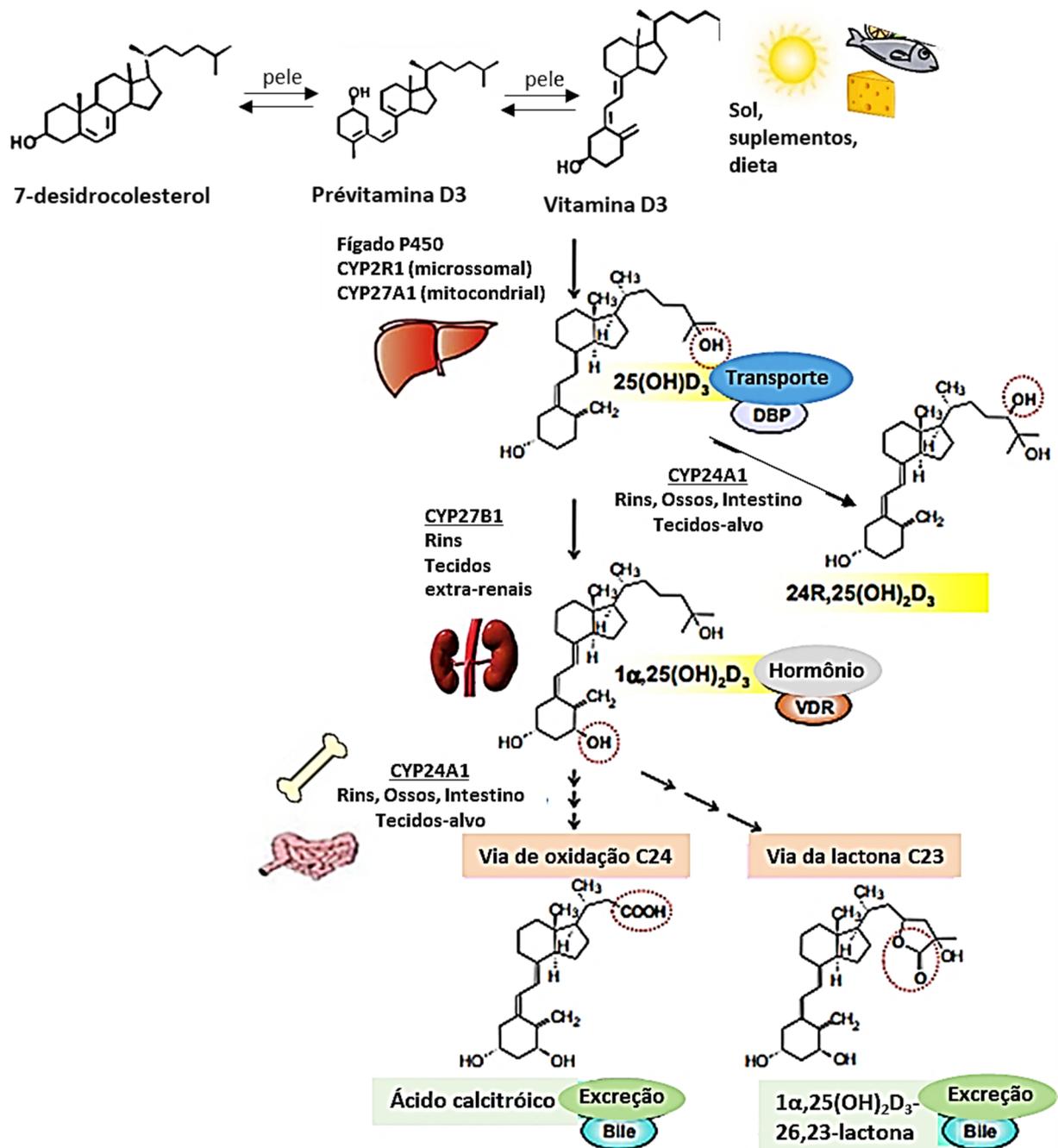
1.4 VITAMINA D₃

A vitamina D₃ compreende um grupo de moléculas lipossolúveis denominado secoesteróide (NORMAN, 2008). Pode ser obtida de forma exógena (10 a 20%), proveniente da dieta, como peixes de águas profundas (salmão e atum), leite e cogumelos; ou endógena (80 a 90%) a partir da pele, devido à exposição da luz solar (principalmente radiação ultravioleta B – UVB, 290 – 315 nm) tendo como precursor o 7-desidrocolesterol, um metabólito do colesterol presente na epiderme (BOUILLON et al., 1995). A síntese cutânea de vitamina D₃ ocorre através de um processo não enzimático, na qual, a absorção dos raios UVB resulta na conversão do 7-desidrocolesterol para pré-colecalciferol (pré-vitamina D₃). Pré-colecalciferol é inerentemente instável e sob a influência da temperatura corporal, é imediatamente convertido em colecalciferol (vitamina D₃), para posteriormente ser absorvido pela corrente sanguínea (NAIR; MASEEH, 2012) (Figura 7).

A vitamina D₃ só possui atividade biológica mediante um processo de hidroxilação que ocorre em duas etapas (BOUILLON et al., 1995). Primeiramente ela é metabolizada no fígado, pela ação de enzimas do citocromo P450, como CYP2R1 e CYP27A1 (25-hidroxilases), onde então é convertida em 25 (OH) D₃ (25-D₃), a principal forma circulante. O segundo passo da hidroxilação ocorre nos rins e requer a enzima do citocromo P450, CYP27B1 (1 α , 25-hidroxilase), para formar o principal metabólito ativo, 1,25 (OH)₂ D₃ (1,25-D₃) ou calcitriol, e o metabólito menos ativo 24R, 25(OH)₂ D₃. Os metabólitos di-hidroxilados 24R, 25(OH)₂ D₃ e

1,25(OH)₂D₃ são transportados sistemicamente para os órgãos-alvo distais (NORMAN et al., 1993) (Figura 7). Esta segunda etapa da reação de hidroxilação é estimulada principalmente pelo hormônio da paratireóide (PTH) e inibida pelo fator de crescimento de cálcio, fosfato e fibroblasto-23 (FGF-23) (HENRY, 2011). Uma queda nas concentrações de cálcio sérico resulta em estímulo e aumento na secreção de PTH e mobiliza mais cálcio proveniente do tecido ósseo. O PTH, por sua vez aumenta, a síntese de 1,25-D₃ nos rins, que por retorno negativo, estimula a mobilização de cálcio do osso e do intestino e regula a síntese de PTH (EL-FAKHRI et al., 2014).

A vitamina D₃ é um hormônio regulador de cálcio / fósforo, envolvido na homeostase destes íons e indispensável para uma adequada mineralização esquelética e atividade neuromuscular (WANG; DELUCA, 2011). Este hormônio pluripotente possui uma estrutura conformacional flexível e dinâmica, que confere a capacidade de gerar respostas fisiológicas em vários tecidos alvos, por meio da ativação de mecanismos de ação genômicos e não genômicos (BOUILLON et al., 1995; HAUSSLER et al., 2011). A geração de respostas biológicas apropriadas ocorre mediante ligação da 1,25-D₃ ao receptor nuclear (VDR)*nuc*, receptor de membrana plasmática (VDR)*mem*, ou ambos, expressos amplamente em pelo menos 40 tecidos (NORMAN, 2012). Um componente crucial para o mecanismo de ação da vitamina D₃ é a ligação à proteína ligadora de vitamina D₃ (DBP) no plasma, que transporta a vitamina D₃ e os metabólitos para os órgãos-alvo (BISHOP et al., 1994).

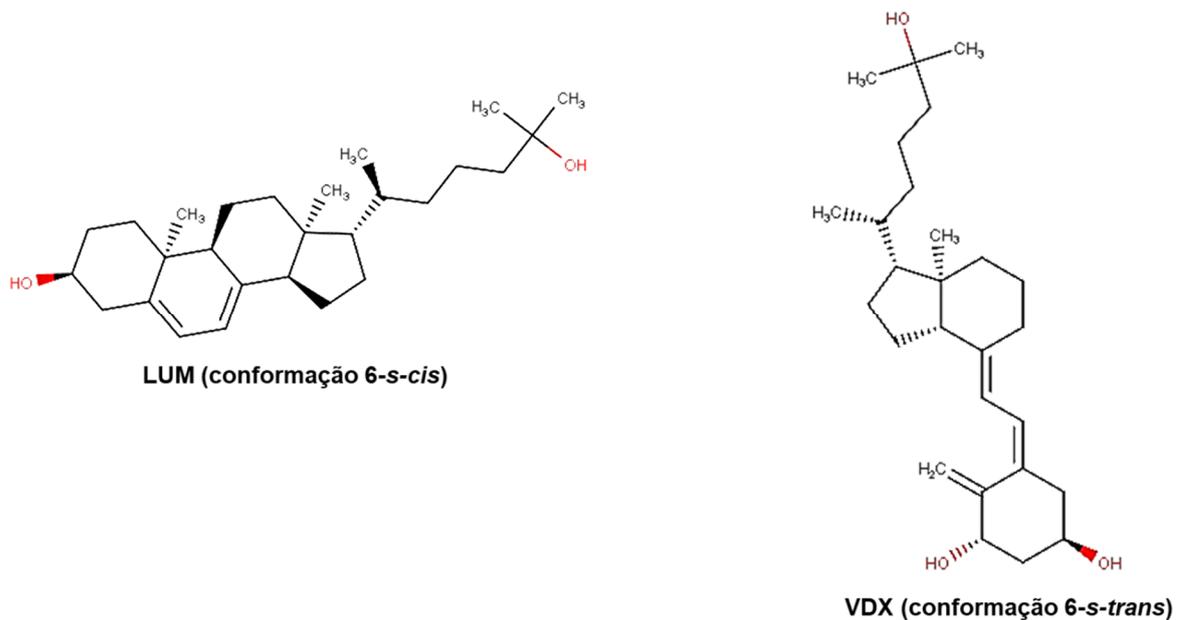
FIGURA 7 – Vias de ativação e inativação da vitamina D₃.

A vitamina D₃, absorvida pela dieta ou sintetizada pela pele através da exposição aos raios UVB, é armazenada no fígado e no tecido adiposo. A primeira reação para a ativação ocorre principalmente no fígado, através da hidroxilação no carbono C-25 da cadeia lateral, mediado pelas enzimas CYP2R1 e CYP27A1. Agora denominada 25-hidroxivitamina D (25 (OH) D₃), é transportada do fígado para os rins, ligada à proteína plasmática de ligação à vitamina D (DBP, também conhecida como proteína Gc). A segunda reação da ativação ocorre principalmente no túbulo proximal através da ação da 25(OH) D₃-1 α -hidroxilase, CYP27B1, para produzir o hormônio secoesteróide ativo, a 1,25 dihidroxivitamina D (1,25-D₃). O hormônio ativo é transportado para vários tecidos alvos da vitamina D₃ (entre eles os rins, intestino e ossos) onde se liga ao receptor nuclear de vitamina D (VDR). O VDR ligado à DBP heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR) e modula a expressão de 200 a 800 genes, incluindo a regulação positiva da 24-hidroxiase, CYP24A1, que degrada 1,25-D₃. A 24-hidroxiase e a 1 α -hidroxilase são reciprocamente expressas para regular as concentrações de 1,25-D₃. A expressão da atividade da 24-hidroxiase produz 24,25(OH)₂D₃ a partir da 25(OH) D₃, que está implicitamente envolvida na cicatrização de fraturas ósseas, mas o CYP24A1 inativa predominantemente a 1,25-D₃ por uma série de reações sequenciais de

hidroxilação e oxidação para produzir ácido calcitróico, que é excretado pela bile, ou 1,25 (OH) 2D₃-26,23-lactona, que é um antagonista fraco do VDR. Fonte: Adaptado de (FELDMAN; PIKE; ADAMS, 2018).

Cabe ressaltar que a estrutura molecular da 1,25-D₃ é altamente flexível. Assim, as conformações da 1,25-D₃ (6-*s-cis* e 6-*s-trans*) resultam de uma rotação de 360 graus em torno da ligação 5,6 carbono-carbono a uma taxa de milhões de vezes por segundo (HAUSSLER et al., 2011). Esta mudança conformacional possibilita que a molécula interaja com uma ampla diversidade de proteínas.

FIGURA 8 – Estruturas químicas 2D dos ligantes VDX e LUM.



Flexibilidade conformacional dos ligantes LUM (6-*s-cis*) e VDX (6-*s-trans*)
Fonte: O autor.

1.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE VITAMINA D₃ E DM2

A deficiência de vitamina D₃ está associada a diversas condições de saúde, dentre elas, doença cardiovascular (DCV) (RAI; AGRAWAL, 2017), obesidade (HUSSAIN GILANI et al., 2019), síndrome metabólica (Kim et al., 2018), câncer (Mondul et al., 2017), doença renal

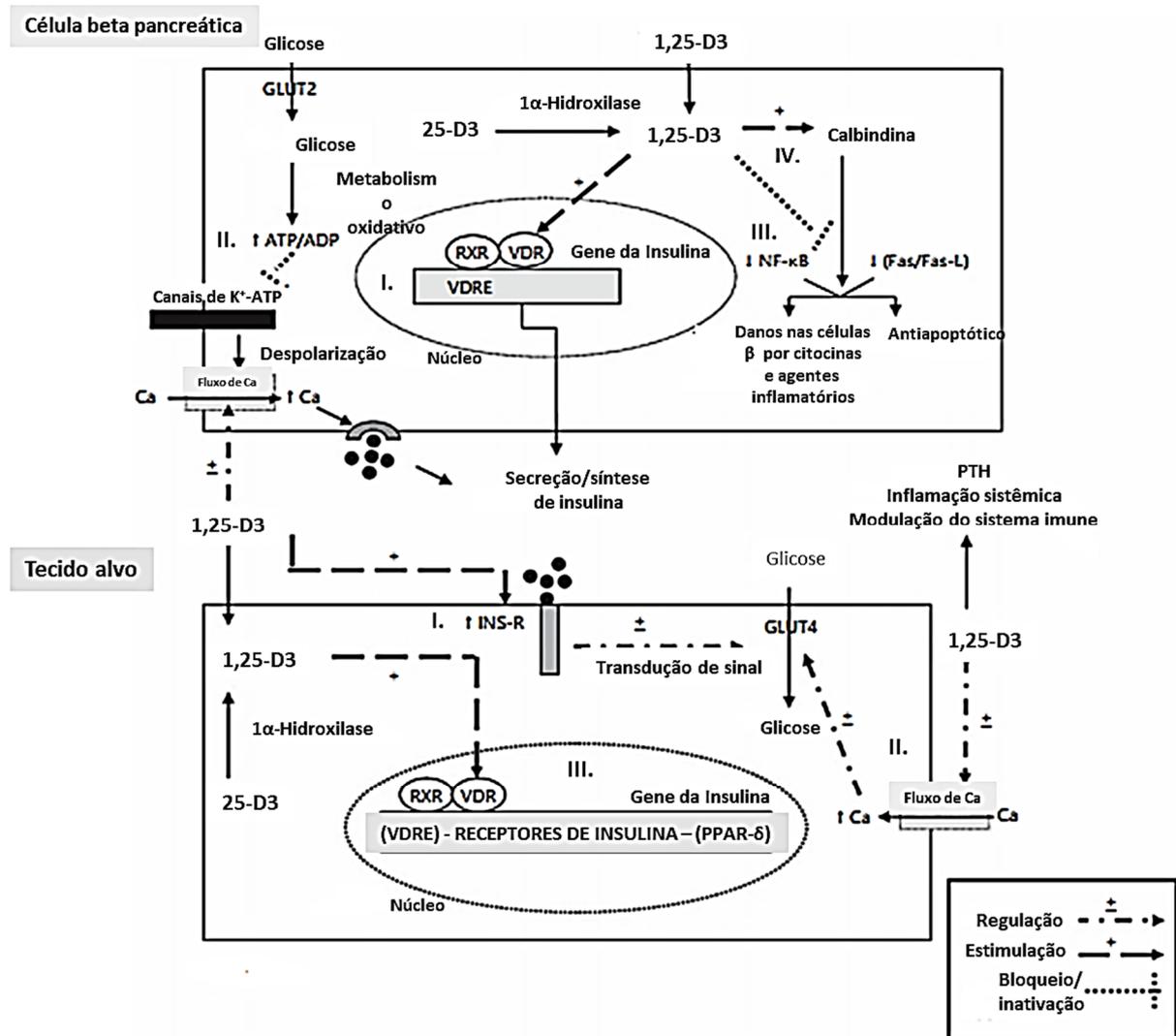
crônica (DRC) (FERNÁNDEZ-JUÁREZ et al., 2013), diabetes (XUAN; ZHAO; LIU, 2013), entre outras.

Estudos sugerem uma possível relação entre concentrações inferiores de vitamina D₃ e alterações na homeostase glicêmica. Além disso, a relação entre concentrações insuficientes de vitamina D₃ e estados pré-diabéticos ou diabetes é investigada, segundo a literatura. Em estudos com animais e humanos foi relatado que a deficiência de vitamina D₃ pode estar relacionada à síntese e secreção de insulina prejudicadas (BORISSOVA et al., 2003; BOUCHER et al., 1995). Em roedores, foi demonstrado que a vitamina D₃ está positivamente correlacionada com a sensibilidade à insulina, e este efeito é mediado tanto pelo mecanismo direto, através da disponibilidade de receptores de vitamina D₃ (VDR) em vários tecidos, quanto indiretamente, através de alterações nas concentrações de cálcio (CHOW et al., 2013). Um estudo conduzido em adultos saudáveis mostrou que a suplementação diária com vitamina D₃ aumentou significativamente as concentrações séricas de 25-D₃ e 1,25-D₃ e reduziu as concentrações de glicose de jejum, bem como a resistência à insulina, em população japonesa (SUN et al., 2016). Esses efeitos foram independentes de fatores como atividade física ou acúmulo de gordura visceral. Além disso, as concentrações séricas de PTH reduziram significativamente no grupo suplementado com a vitamina D₃. Semelhante a este efeito, estudos prévios reportaram que a suplementação com vitamina D₃ aumentou significativamente a sensibilidade periférica a insulina e a função das células β pancreáticas (LEMIEUX et al., 2019), bem como melhorou o controle glicêmico e outros parâmetros metabólicos (UPRETI et al., 2018) de pacientes com alto risco ou diagnosticados recentemente com DM2, sugerindo que a mesma pode retardar a deterioração metabólica nessa população (LEMIEUX et al., 2019). Corroborando com estes relatos, foi sugerido que concentrações séricas insuficientes de vitamina D₃ devem contribuir para o aumento da incidência de pré-diabetes ou DM2 na população chinesa (GAO et al., 2018). À vista disso, a suplementação com vitamina D₃ pode atingir concentrações suficientes e caracterizar uma promissora terapia adjuvante para pacientes com DM2 e com hipovitaminose D₃ coexistente (UPRETI et al., 2018). Além disso, a 1,25-D₃ ativa a biossíntese *de novo* de insulina em ilhotas pancreáticas (de ratos deficientes em vitamina D₃), mediante um intenso estímulo de glicose. Este processo poderia contribuir para o aumento na taxa de conversão de pró-insulina em insulina, que por sua vez, pode estar relacionado a um efeito direto ou indireto dependente de cálcio (BOURLON; BILLAUDEL; FAURE-DUSSERT, 1999).

Existem vários mecanismos biológicos sugeridos pelo qual a vitamina D₃ pode contribuir para o controle glicêmico. Essa evidência inclui a presença de receptores VDR e a expressão

de enzimas 1α -hidroxilase nas células β pancreáticas, juntamente com a existência de elementos de resposta a vitamina D_3 localizados na região promotora do gene da insulina humana (BLAND et al., 2004; MAESTRO et al., 2003). A vitamina D_3 também pode contribuir indiretamente para a homeostase glicêmica através de estímulo na secreção de insulina, através da regulação do fluxo de cálcio, combinado a regulação da síntese da calbindina, uma proteína ligadora de cálcio dependente de vitamina D_3 , presente nas células β pancreáticas (LEE et al., 1994). Outro mecanismo possível que explica o envolvimento da vitamina D_3 na glicemia é através do aumento da sensibilidade dos tecidos alvo da insulina, principalmente de pacientes obesos (CEFALO et al., 2018), bem como, os efeitos benéficos no metabolismo da insulina e perfil lipídico (DASTORANI et al., 2018). Esta hipótese pode ser sustentada pela presença de receptores VDR em locais alvo da insulina, como músculo esquelético e tecido adiposo, juntamente com a regulação positiva dos receptores de insulina (INS-R) após o tratamento com $1,25-D_3$ (MAESTRO et al., 2000).

Os mecanismos envolvidos com a ação da $1,25-D_3$ para a homeostase da glicose nas células β pancreáticas e nos tecidos alvo da insulina estão ilustrados na figura 9.

FIGURA 9 – Papel da 1,25-D₃ na homeostase glicêmica e a função nas células β pancreáticas.

Célula β pancreática (acima): A fonte de 1,25-D₃ pode ser proveniente da circulação sanguínea ou das células β pancreáticas. I. A 1,25-D₃, ligada ao receptor VDR, forma um complexo com o receptor de ácido retinóico (RXR). Este complexo (1,25-D₃-VDR-RXR) se liga ao elemento de resposta da vitamina D (VDRE) situado na região promotora do gene da insulina humana, aumentando assim a regulação transcricional positiva do gene da insulina e conseqüentemente a síntese de insulina. II. A 1,25-D₃ melhora a secreção de insulina e a tolerância à glicose também através da regulação indireta do cálcio intracelular, aumentando a razão ATP / ADP, resultando no fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP (K⁺-ATP) da membrana plasmática, aumentando o influxo de cálcio e despolarização da célula, levando à exocitose de grânulos de insulina. III. A modulação da secreção e dos efeitos das citocinas e das vias apoptóticas ocorre através da interação do complexo 1,25-D₃-VDR-RXR com VDRE nos genes das citocinas, inativação de NF-κB e supressão do receptor Fas, contribuindo assim para a sobrevivência das células β pancreáticas. IV. A 1,25-D₃ também regula positivamente a calbindina, uma proteína citosólica de ligação ao cálcio encontrada nas células β, que atua como um modulador de liberação de insulina estimulada pela despolarização, através da regulação do cálcio intracelular. A calbindina também pode proteger contra a morte celular apoptótica, induzida por citocinas, através da capacidade de armazenamento de cálcio intracelular. Tecidos alvo (abaixo): I. A 1,25-D₃ estimula a expressão dos receptores de insulina e a transdução de sinalização, resultando na translocação do transportador GLUT4 para a membrana e no transporte de glicose nos tecidos periféricos. II. Os efeitos da 1,25-D₃ também podem ser mediados através do importante papel na regulação do cálcio extracelular, fluxo de cálcio e cálcio intracelular. Alterações no fluxo de cálcio podem influenciar a translocação das vesículas GLUT4, responsáveis pela captação de glicose nos tecidos periféricos alvos da insulina. III. A 1,25-D₃ causa a ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissomo tipo gama (PPAR-δ), um fator

de transcrição implicado na regulação do metabolismo dos ácidos graxos. Fonte: Adaptado de (EL-FAKHRI et al., 2014).

1.6 VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK/ERK 1/2

A via de sinalização da proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno (MAPK) é um componente-chave de várias vias importantes de sinalização intracelular e abrange quatro vias clássicas distintas: as cinase reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2), Jun N-terminal cinase (JNK1/2/3), p38-MAPK e ERK5. A via das proteínas cinase ativadas por mitógeno reguladas por sinal extracelular (MAPK/MEK/ERK) é especialmente relacionada a proliferação celular, diferenciação, migração, senescência e apoptose (SUN et al., 2015).

A cascata das MAPKs possui importante papel nos mecanismos de sinalização nuclear, e são ativadas por diversos estímulos, incluindo fatores de crescimento, citocinas e estímulos de estresse, bem como muitos agonistas de sinalização farmacológica. Sinais extracelulares são transduzidos para o núcleo através de uma cascata de sinalização que provoca mudanças nos padrões de expressão gênica. Quando MAPK é fosforilada, é direcionada ao ambiente nuclear e, por sua vez, fosforila fatores de transcrição, designados como efetores à jusante, resultando na regulação de genes específicos (SCHWARTZ et al., 2001). Além da fosforilação de fatores de transcrição específicos, as MAPKs e cinases à jusante provocam alterações rapidamente direcionadas ao ambiente da cromatina de genes específicos, modulando a fosforilação e/ou acetilação de proteínas nucleossômicas e da cromatina (THOMSON; MAHADEVAN; CLAYTON, 1999).

Importantes efeitos da 1,25-D₃ estão associados a via de sinalização das MAPKs, mais especificamente da MAPK/ERK1/2 em diferentes tecidos. Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina também estimula a cascata de fosforilação das MAPKs (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Condições de hiperglicemia severa estimulam a fosforilação e ativação de MAPKs, o que pode mediar a infiltração de macrófagos, inflamação e injúria tecidual. Nesse contexto, a 1,25-D₃ confere ação renoprotetora por regular a enzima conversora de angiotensina (ECA e ECA2) em células tubulares do epitélio renal em condições de alta concentração de glicose, através da inibição das vias de sinalização ERK 1/2 ou p38 MAPK. Dessa forma, a inibição da via de sinalização MAPK/ERK 1/2 pela 1,25-D₃ evita danos

renais críticos induzidos pela hiperglicemia, sugerindo ser um potente alvo terapêutico aos danos microvasculares causados pela diabetes, como a nefropatia (LIN et al., 2016). O tratamento com 1,25-D₃ sozinha ou associada a fitoterápico, também atenua cardiomiopatia em ratas diabéticas, bem como, nos neonatos, por inibir as vias Raf-1/MEK/ERK1/2, conferindo ação anti-apoptótica, anti-oxidante e anti-inflamatória, o que contribuiria para evitar danos cardíacos causados por esta comorbidade (EL-MANSI; AL-KAHTANI, 2019). O ácido ursólico, um importante triterpeno assim como a 1,25-D₃, também atua através da atividade nuclear e vias das MAPKs, ambas também envolvidas na cascata de fosforilação da insulina, promovendo a regulação da homeostase glicêmica, que envolve secreção de e sensibilização à insulina, com também participação do cálcio no mecanismo de ação, e a expressão de GLUT4 no músculo esquelético (CASTRO et al., 2015a).

A via MAPK/ERK 1/2 é a principal via de sinalização relacionada ao estresse e à inflamação (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012; SEO et al., 2015). Existe ampla evidência sugerindo que as vias das MAPKs são vitais para a síntese e amplificação de citocinas pró-inflamatórias (CARTER; MONICK; HUNNINGHAKE, 1999). Neste contexto, a 1,25-D₃ inibe potentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e melhora a toxicidade induzidos por ácidos graxos livres e bactérias gram-negativas, e este evento está associado a inibição da atividade das vias MAPK/ERK1/2, p38 e JNK em macrófagos (LI et al., 2018; XU et al., 2016) e em células da neuroglia (HUANG et al., 2015). Estes dados sugerem que a suplementação com vitamina D seja uma alternativa terapêutica a fim de inibir respostas inflamatórias induzidas por ácidos graxos livres ou bactérias gram-negativas, através da inibição da via de sinalização MAPK/ERK 1/2. Este efeito anti-inflamatório também é atribuído ao Maxacalcitol (análogo da 1,25-D₃) por diminuir a hiperfosforilação da MAPK/ERK 1/2, p38 e proteínas tau, diminuindo assim a neuroinflamação e carga β amilóide e melhorando significativamente a disfunção cognitiva e o quadro histopatológico de cérebro de ratos com Alzheimer (SAAD EL-DIN et al., 2020). Além disso, o efeito anti-inflamatório da 1,25-D₃ também é observado no tecido adiposo, por diminuir a secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos e a quimiotaxia de monócitos. Esses efeitos são mediados pela inibição das vias de sinalização MAPK/ERK 1/2 e NF κ B, onde a 1,25-D₃ reduz significativamente o imunoconteúdo da proteína ERK 1/2 fosforilada em adipócitos (DING; WILDING; BING, 2013), seguido de diminuição na expressão gênica de citocinas associadas à inflamação (IL-6 e TNF- α) e aumento da expressão do receptor VDR no músculo esquelético (CHOI et al., 2013). O papel do receptor VDR (citoplasmático ou associado aos caveolae de membrana) é crucial

para a atividade da 1,25-D₃, e capaz de gerar respostas rápidas de sinalização não genômica, envolvendo a ativação da via das MAPKs que regulam positivamente genes envolvidos no controle da progressão do ciclo celular (BUITRAGO; PARDO; BOLAND, 2013).

Os membros da via MAPK/ERK 1/2 (p42/p44) são importantes mediadores da transdução de sinais derivados externamente da superfície celular para o núcleo e modulam a expressão de diversos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular (SCHAEFFER; WEBER, 1999). Estudo anterior sugere que a ERK 1/2 induzida por estrógeno (E2) está envolvida na regulação positiva da expressão do gene VDR em células cancerígenas de cólon e mama (GILAD et al., 2005). A 1,25-D₃ então inibe a cascata de sinalização MAPK/ERK 1/2 ao inativar a tirosina cinase da família *Src* (envolvida na via que leva à ativação da ERK 1/2 pelo soro), através de um mecanismo potencialmente mediado por VDR. Nesse contexto, a 1,25-D₃ aumenta o estado de tirosina fosforilada de *Src*, além de inibir a atividade cinase e induzir a associação do VDR com *Src* (ROSSI et al., 2004). Foi descrito que a via de sinalização MAPK/ERK 1/2 é capaz de mediar os efeitos da 1,25-D₃ em osteoblastos (SCHWARTZ et al., 2001). A 1,25-D₃ também confere efeitos antiproliferativos rápidos mediados pelas cascatas MAPK/ERK 1/2 e JNK em células de osteossarcoma humano, podendo ser potenciais agentes moleculares alvos no tratamento do câncer ósseo (WU; ZHANG; ZANELLO, 2007).

Os efeitos descritos da 1,25-D₃ através da via de sinalização MAPK/ERK 1/2 em diferentes tecidos, elucidam a importância do papel desta via no mecanismo de ação do hormônio, dando ênfase principalmente na homeostase glicêmica.

2 HIPÓTESE

A Vitamina D₃ e o metabólito ativo (1,25-D₃) previnem a condição de resistência à insulina induzida em ratos. A 1,25-D₃ atua nas células β pancreáticas contribuindo para a secreção de insulina através de canais iônicos e participantes à jusante. Além disso, a 1,25-D₃ nas conformações *6-s-cis* ou *6-s-trans* interagem favoravelmente com receptores da membrana plasmática podendo ativar vias de sinalização intracelulares que podem contribuir para a sobrevivência das células β pancreáticas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

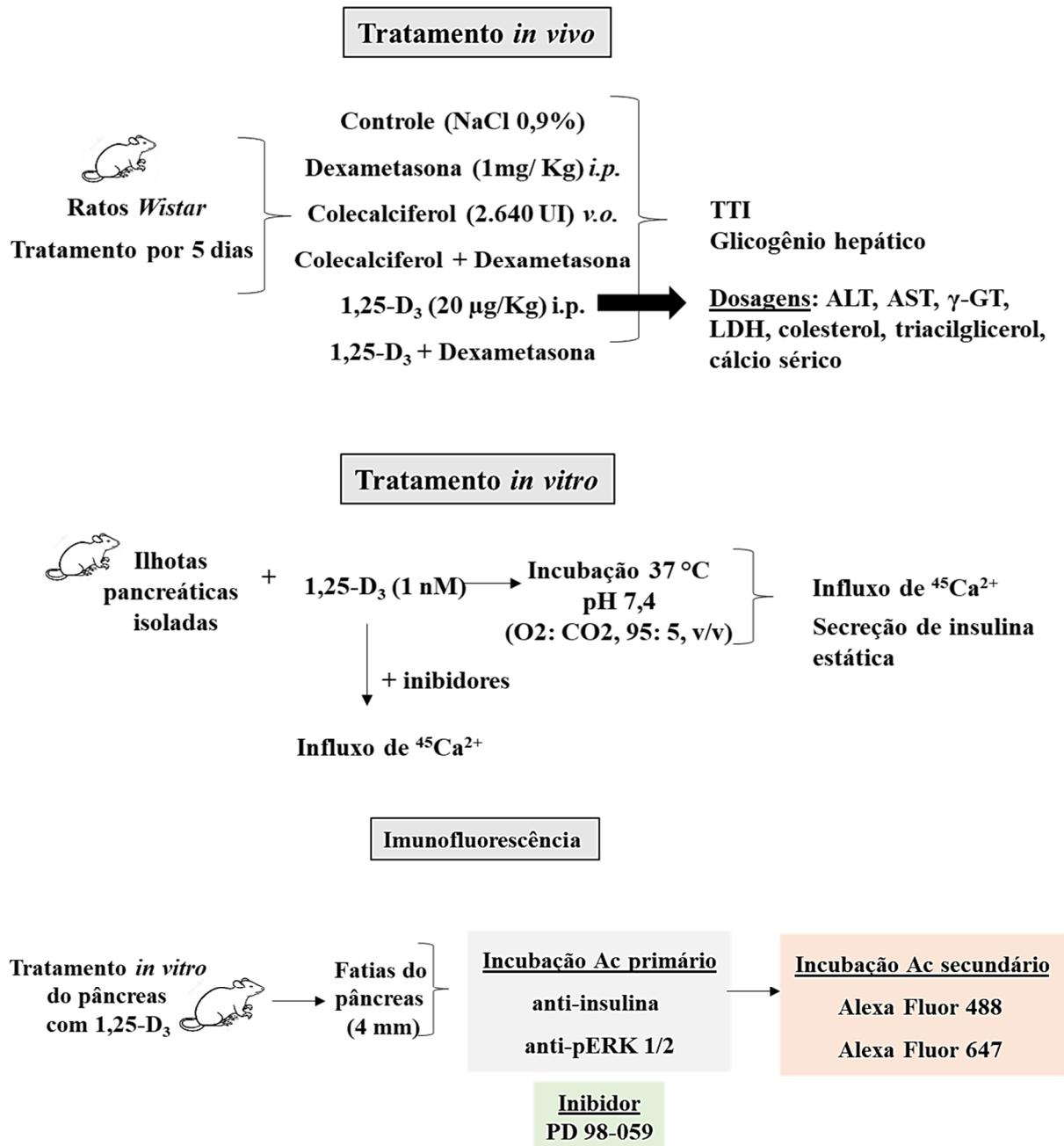
Estudar o papel da 1,25-D₃ na homeostasia glicêmica e os mecanismos envolvidos para o estímulo da secreção de insulina, incluindo também a via MAPK/ERK1/2 e comprovar a interação entre a 1,25-D₃ e algumas proteínas-alvo (ERp57 e PKC) que contribuem para a sobrevivência das células β pancreáticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

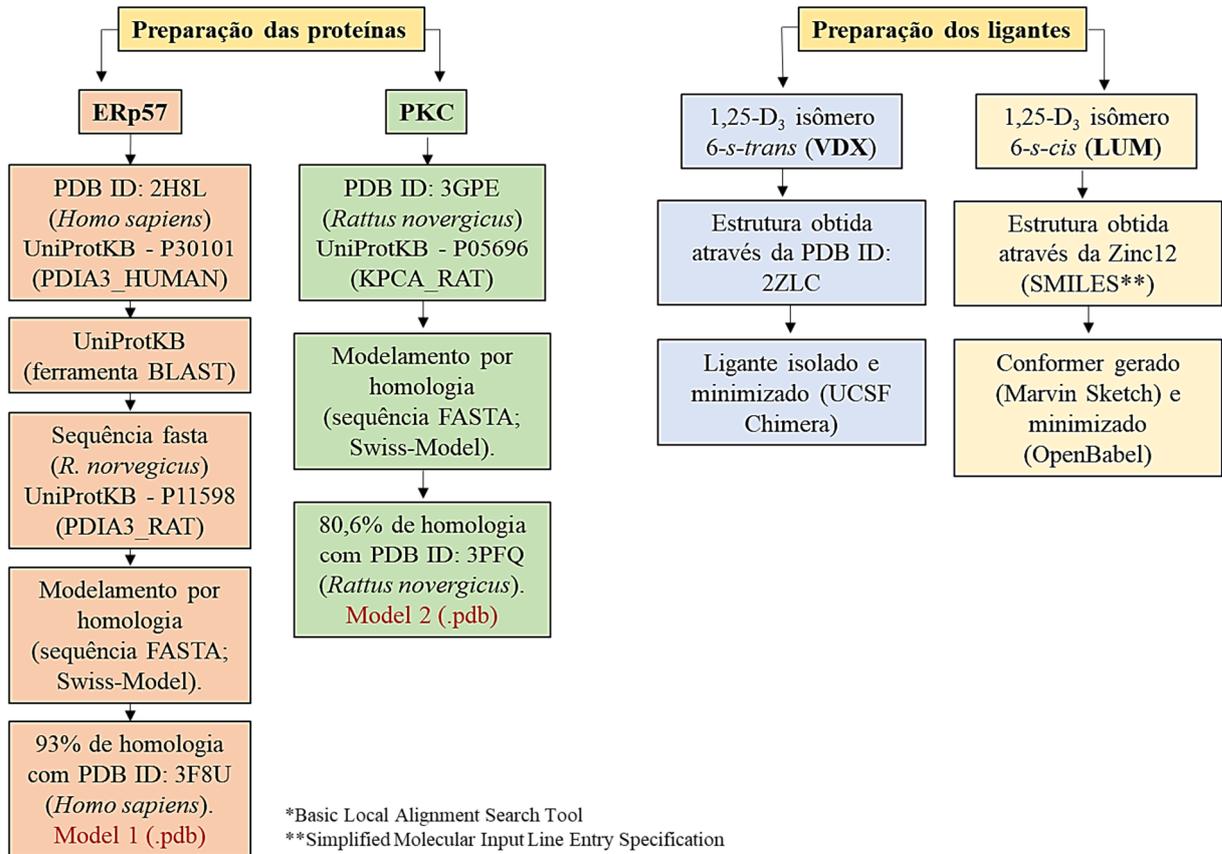
- Estudar o efeito da 1,25-D₃ e do colecalciferol na glicemia de ratos normoglicêmicos e resistentes à insulina.
- Avaliar o efeito da 1,25-D₃ e do colecalciferol no conteúdo de glicogênio hepático;
- Avaliar o efeito da 1,25-D₃ e nas concentrações de AST, ALT, γ -GT, LDH, colesterol total, triacilglicerol e cálcio sérico;
- Estudar o mecanismo pelo qual a 1,25-D₃ modula a secreção de insulina pelas células β pancreáticas.
- Estudar o efeito da 1,25-D₃ no influxo de cálcio nas células β pancreáticas e caracterizar o envolvimento deste íon na translocação de vesículas secretórias contendo os grânulos de insulina;
- Destacar os possíveis mecanismos envolvidos na ação da 1,25-D₃ para a secreção de insulina, através de ativadores / inibidores de canais iônicos e proteínas intracelulares;
- Verificar a presença (co-localização) das proteínas MAPK/ERK 1/2 nas células β pancreáticas, em ilhotas pancreáticas tratadas ou não (controle) com 1,25-D₃ na presença ou ausência do inibidor PD 98-059;
- Analisar o perfil ADMET de cada ligante predito nas bases de dados;
- Verificar as interações funcionais entre as proteínas-alvo com outras proteínas parceiras fisiológicas listadas nas bases de dados.
- Avaliar as possíveis interações entre os ligantes LUM (6-*s-cis*), VDX (6-*s-trans*) e as proteínas ERp57 e PKC;

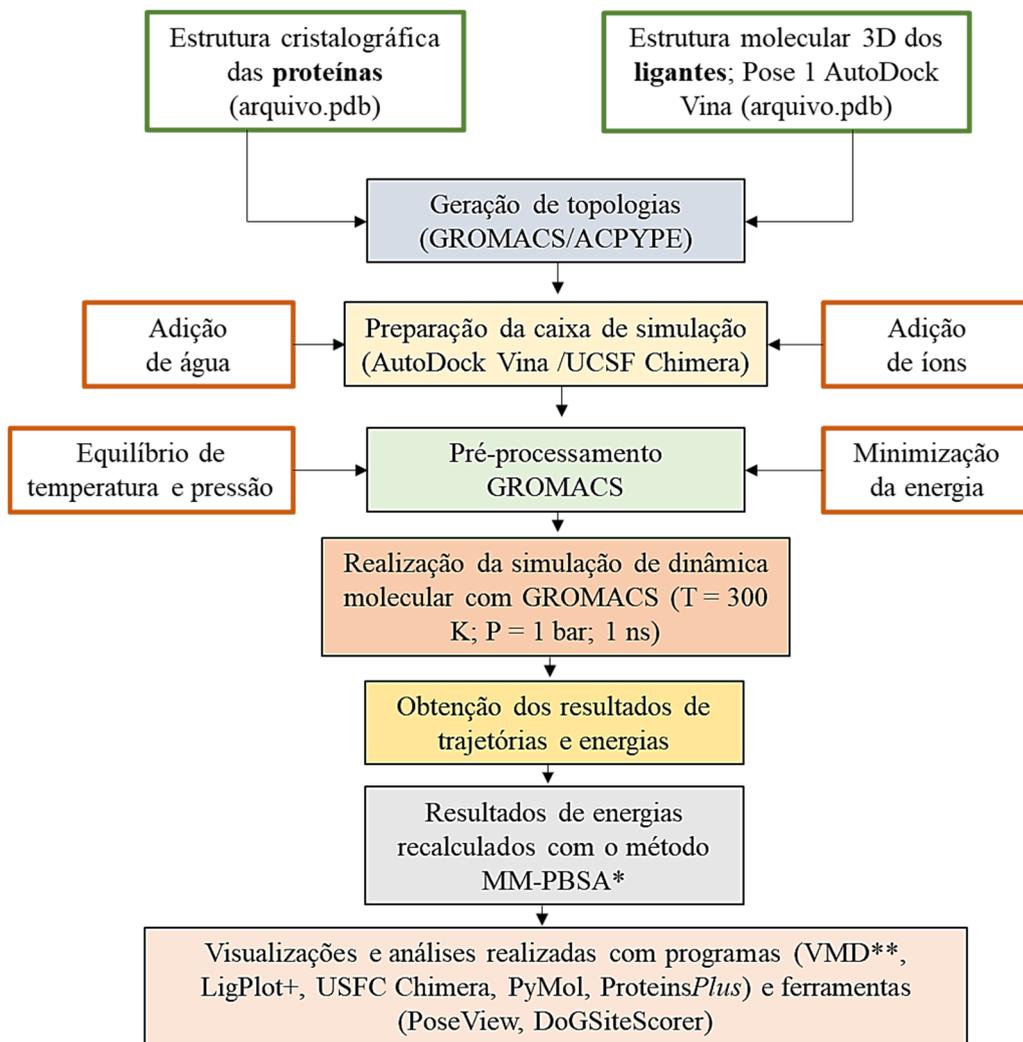
- Analisar os tipos e a contribuição dos resíduos envolvidos nas interações citadas acima;
- Analisar os tipos de energia preditos em cada interação e os valores associados;
- Identificar as cavidades preditas em cada interação, bem como, a composição de resíduos de aminoácidos;
- Analisar as superfícies hidrofóbicas e os potenciais eletrostáticos preditos nas interações proteínas-ligantes.

4 ESQUEMA METODOLÓGICO DO ESTUDO



Ensaio *in silico* – Docking e Dinâmica Molecular





*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann surface area method

**Visual Molecular Dynamics

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Químicos

1 α , 25-Di-hidroxivitamina D₃ (1,25-D₃), nifedipina, 1,2 bis (2 - aminofenoxi) etano N, N, N0, N0 Tetraacético ácido tetraquis (éster acetoximetílico) (BAPTA-AM), glibenclamida, diazoxide, dantrolene, tapsigargina, N-etilmaleimida, colchicina, borato de 2-aminoetoxidifenil (2-APB), cloridrato de bisindolilmaleimida XI (RO 32-0432), (9S, 10S, 12R) -2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-hidroxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi- Éster hexílico do ácido 1H-diindolo [1,2,3-fg: 3', 2', 1'-l] pirrolo [3,4-i] [1,6] benzodiazocina-10-carboxílico (KT-5720), apamina, PD 98-059, albumina sérica bovina (BSA) e colagenase tipo V foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Company® (St. Louis, MO, USA). O tetraetilamônio (TEA) foi obtido da Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Insulina humana NOVOLIN® R - Novo Nordisk (Kalundborg, Dinamarca), fosfato dissódico de dexametasona Decadron® injetável – Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A (São Paulo, SP, Brasil) e colecalciferol Addera D₃® - Cosmed Indústria de cosméticos e medicamentos S/A (São Paulo, SP, Brasil) foram adquiridos em farmácia comercial. Todos os produtos químicos eram de grau analítico. Os kits para as dosagens analíticas aspartato aminotransferase (AST-PP), alanina aminotransferase (ALT-PP), gamma-glutamil transpeptidase (γ -GT), lactato desidrogenase (LDH UV), colesterol total (TC), triacilglicerol (TG) e cálcio foram adquiridos da Labtest Liquiform (Lagoa Santa, MG, Brasil). O ensaio de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) para a determinação quantitativa da insulina estática (número de catálogo EZRMI-13K) foi adquirido da Millipore (St. Charles, MO). O cálcio [⁴⁵Ca] CaCl₂ (sp. Act. 321 KBq / mg Ca²⁺) e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foram adquiridos da Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA). Os anticorpos anti-insulina (sc-9168), anti-p44/42 MAP kinase (anti-ERK1/2) (sc-292838), anti-fosfo-p44/42 MAP kinase (anti-p-ERK1/2) (sc-16982), anti-caveolina-1 (7C8) (sc-53564) anti- β -actina (sc-7210) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). O anticorpo anti-VAMP 1/2/3 (cat.no.104102) foi adquirido da Synaptic System GmbH (Gottingen, Alemanha). O padrão de proteínas (29 a 205 KDa SDS-6H) foi adquirido da Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). O kit de substrato HRP (Immobilon™Western chemiluminescence) foi adquirido da Millipore (St Charles, MO; Temecula, CA). Os anticorpos secundários IgG anti-mouse e anti-rabbit conjugados a peroxidase foram adquiridos da GE Healthcare (Amersham, Buckinghamshire, UK). Os

anticorpos secundários rabbit anti-goat IgG conjugado ao Alexa Fluor 488 e goat anti-rabbit IgG conjugado ao Alexa Fluor 647 foram adquiridos da Cell Signaling Technology, Inc. (USA). O reagente FluorSave foi adquirido da Calbiochem Merckmilipore (Darmstadt, Alemanha). 40,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) foi adquirido da Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA). Sais e solventes foram adquiridos de Merck® AG (Darmstadt, Alemanha).

4.1.2 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (180–200 g). Estes foram criados na instalação de animais e alojados em uma sala com temperatura controlada (21 ± 2 ° C) com controle de luz de 12 h (06:00 h - 18:00 h), ciclo claro/escuro, com acesso a água da torneira *ad libitum* e ração padrão para roedores (Nuvilab CR1; Curitiba, Brasil). Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com as recomendações éticas do Comitê de Ética em Uso Animal local (Protocolo CEUA / UFSC / 2119280317).

4.2 METODOLOGIA *IN VIVO*

4.2.1 Tratamento com 1,25-D₃ e teste de tolerância à insulina (TTI)

Os ratos em jejum (2 h) foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 6 animais: I) ratos que receberam solução de cloreto de sódio a 0,9% (1 mg / Kg); II) ratos que receberam 1,25-D₃ 1 nM (20 µg/ Kg); III) ratos que receberam dexametasona (1 mg/ Kg) e IV) ratos que receberam 1,25-D₃ + dexametasona. A dexametasona foi utilizada para criar um modelo de resistência à insulina (RUZZIN; WAGMAN; JENSEN, 2005; SEVERINO et al., 2002). A dexametasona, assim como o cortisol, é um corticosteróide capaz de interferir no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Extremamente catabólica, a dexametasona atua na degradação do glicogênio (glicogenólise), sendo que a concentração e o tempo de tratamento descritos e utilizados neste estudo são capazes de promover uma resistência branda à insulina (DIMITRIADIS et al., 1997). A dose de 1,25-D₃ foi escolhida de acordo com estudos anteriores que demonstraram que 1,25-D₃ *i.p.* teve um efeito positivo na homeostase glicêmica e na

resistência à insulina de camundongos (BENETTI et al., 2018; MEERZA; NASEEM; AHMED, 2012). Todas as soluções foram aplicadas por via intraperitoneal (*i.p.*) durante 5 dias consecutivos. 1,25-D₃ e dexametasona foram dissolvidos em solução de cloreto de sódio a 0,9% (veículo). Todos os ratos foram pesados durante os 5 dias de tratamento. A glicemia foi medida antes da administração da insulina (tempo zero) e os ratos receberam imediatamente insulina humana (2 UI/ Kg). O teste de tolerância à insulina foi iniciado logo após a administração da insulina e a glicemia foi medida nos tempos: 5, 10, 15, 20, 30 e 40 min. Foi utilizada anestesia local (cloridrato de lidocaína) e o sangue foi coletado da veia caudal para determinação da glicemia pela análise eletroquímica com tiras reativas sensíveis à glicose Accu-check® Performa - Roche Pharmaceutical Laboratories (São Paulo, SP, Brasil). Foi realizada uma regressão linear do declínio da glicemia e sua inclinação foi usada para calcular a taxa de constante de decaimento da glicose (KTTI, % glicose/min).

4.2.2 Análises bioquímicas

Ao final do TTI (40 min) o soro dos ratos submetidos aos tratamentos acima mencionados foi separado do sangue total coletado. Para analisar a potencial toxicidade promovida pela 1,25-D₃, as atividades de AST, ALT e γ -GT foram medidas no soro. A redução da absorbância a 340 nm, nessa leitura cinética, foi diretamente proporcional à atividade AST e ALT na amostra (HUANG et al., 2006). A atividade de AST e ALT foi expressa em U/L. Para a medição de γ -GT, foi utilizado teste cinético colorimétrico e em tempo fixo, usando L- γ -glutamil-*p*-nitroanilina como substrato e glicilglicina como molécula aceitadora, em que a quantidade de *p*-nitroanilina formada era diretamente proporcional à atividade de γ -GT na amostra (ORLOWSKI; MEISTER, 1963). A leitura foi realizada a 405 nm e a atividade γ -GT foi expressa em U/L.

A liberação de LDH no meio extracelular foi usada para analisar o efeito *in vivo* da 1,25-D₃ na toxicidade celular. A liberação de LDH foi medida pelo método de oxidação de NADH. A redução da absorbância a 340 nm, resultante nessa leitura cinética, foi diretamente proporcional à atividade do LDH na amostra (NEHAR et al., 1997). Os resultados foram expressos em U/L.

Para analisar o efeito *in vivo* da 1,25-D₃ nas concentrações séricas de TG e CT, os mesmos foram dosados pelo método de glicerolfosfato oxidase e colesterol oxidase, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg/ dL (DOMINICZAK; CASLAKE, 2011).

Para analisar o efeito *in vivo* da 1,25-D₃ na concentração sérica de cálcio, o mesmo foi dosado pelo complexo com cresolfaleína complexona. Os resultados foram expressos em mg/dL (GOMES CASTRO et al., 2014). Para todas as dosagens reportadas acima, foram utilizados kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.3 Tratamento com colecalciferol (25-D₃) e teste de tolerância à insulina (TTI)

Os ratos em jejum (2 h) foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 8 animais: I) ratos que receberam solução de cloreto de sódio 0,9% (1 mg/ Kg); II) ratos que receberam colecalciferol (2.640 UI; 1.8 mM) por gavagem oral (*v.o.*); III) ratos que receberam dexametasona (1 mg/ Kg) por via intraperitoneal (*i.p.*) e IV) ratos que receberam colecalciferol + dexametasona. A dose de colecalciferol foi escolhida de acordo com um estudo anterior demonstrando que a suplementação com vitamina D₃, por administração oral, teve um efeito positivo na homeostase glicêmica e na secreção de insulina de ratos (GEORGE et al., 2012). Todas as soluções foram aplicadas por 5 dias consecutivos. A dexametasona foi dissolvida em solução de cloreto de sódio a 0,9% (veículo). Todos os ratos foram pesados durante os 5 dias de tratamento. A glicemia foi medida antes da administração da insulina (tempo zero) e os ratos receberam imediatamente insulina humana (2 UI/ Kg). O TTI foi iniciado logo após a administração da insulina e a glicemia foi medida nos tempos: 10, 20 e 40 min. Foi utilizada anestesia local (cloridrato de lidocaína) e o sangue foi coletado da veia caudal para determinação da glicemia pela análise eletroquímica com tiras reativas sensíveis à glicose Accu-check® Performa - Roche Pharmaceutical Laboratories (São Paulo, SP, Brasil). Foi realizada uma regressão linear do declínio da glicemia e a inclinação foi usada para calcular a taxa de constante de decaimento da glicose (KTTI, % glicose/min).

4.2.4 Determinação do conteúdo de glicogênio hepático

Para determinar o conteúdo de glicogênio, o fígado foi removido dos ratos controle e dos ratos submetidos aos tratamentos mencionados acima, ao final do TTI. Os tecidos foram pesados e digeridos com KOH a 33% e fervidos a 100 ° C por 20 min. Foi adicionado etanol a 96% e as amostras foram fervidas, seguidas de banho de gelo para precipitar o glicogênio. As

amostras foram então centrifugadas a 1300 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em água (KAPPEL et al., 2012). O conteúdo de glicogênio foi quantificado com reagente de iodo e, em seguida, foi lido em espectrofotômetro a 460 nm (KRISMAN, 1962). Os resultados foram expressos em mg de glicogênio por grama de tecido (GOMES CASTRO et al., 2018).

4.3 METODOLOGIA *IN VITRO*

3.4.1 Isolamento das ilhotas pancreáticas

O ducto biliar foi pinçado na extremidade do duodeno e canulado com agulha e seringa. Foi introduzido tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb HEPES) (composição em mM: 122 NaCl, 3 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,3 CaCl₂, 0,4 KH₂PO₄ e 25 NaHCO₃ suplementado com 8 mM HEPES, pH 7,4) no ducto biliar por seringa. O pâncreas foi removido para isolamento das ilhotas (FREDERICO et al., 2013). Alíquotas de ilhotas foram incubadas em meio KRb HEPES para medir o influxo de cálcio ou para a medição estática de insulina (FREDERICO et al., 2013). A secreção de insulina estática foi dosada por ELISA. Os isolados das ilhotas pancreáticas foram incubados por 1 min em tampão KRb HEPES contendo glicose 5 mM com ou sem 1,25-D₃ (1 nM). As proteínas totais foram quantificadas pelo método Lowry (LOWRY et al., 1951) no equipamento Multileitora Infinite M200 TECAN no Laboratório de Estudos de Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/CCB-UFSC).

3.4.2 Influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas isoladas

As ilhotas pancreáticas isoladas foram pré-incubadas em tampão KRb HEPES contendo glicose 5 mM e 0,1 µCi / mL de ⁴⁵Ca²⁺ por 60 min (pré-incubação) em incubadora metabólica Dubnoff a 37° C, pH 7,4, em atmosfera úmida na presença de carbogênio (O₂: CO₂, 95:5, vol / vol) na ausência (grupo controle) ou presença de 1,25-D₃ (1 pM, 1 nM e 1 mM). Os ativadores / bloqueadores de canais foram adicionados aos 45 min de incubação, correspondendo a 15 min antes do tratamento com 1,25-D₃, e mantidos durante todo o período final de incubação (FREDERICO et al., 2013). Foram utilizados os seguintes compostos: diazoxide 250 µM; RO 32-0432 50 µM; glibenclamida 20 nM (MENDES et al., 2018); nifedipina 1 µM (FREDERICO et al., 2013); BAPTA-AM 50 µM (ALTENHOFEN et al., 2017); dantrolene 50 µM

(ZANATTA et al., 2012); TEA 20 mM; taspigargina 1 μ M (SULIS et al., 2019); *N*-etilmaleimida 1 mM; colchicina 1 μ M (FREDERICO et al., 2018); 2-APB 100 μ M (ZANATTA et al., 2019); apamina 1 μ M (DA LUZ et al., 2016) e KT-5720 1 μ M (ZAMONER et al., 2007). As ilhotas foram tratadas por 1 min com 1,25-D₃ e a incubação foi interrompida com tampão de cloreto de lantânio (10 mM) a 2 °C para bloquear o influxo de ⁴⁵Ca²⁺ (KAPPEL et al., 2013). Aliquotas de cada amostra foram separadas para medição da radioatividade em líquido de cintilação, utilizando um espectrômetro de cintilação, Tri-Carb 3180[®] TR/SL spectrometer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) (KAPPEL et al., 2013) e para dosagem de proteínas pelo método Lowry (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos em % do controle.

3.4.3 Secreção induzida de insulina pelas ilhotas pancreáticas

As ilhotas pancreáticas isoladas foram pré-incubadas em tampão KRb HEPES, contendo glicose 5 mM, em uma incubadora metabólica do tipo Dubnoff a 37 ° C, pH 7,4 em atmosfera úmida na presença de carbogênio (O₂: CO₂, 95: 5, vol / vol). As ilhotas foram incubadas com 1,25-D₃ (1 nM) por 10 min. As medições de insulina estática no meio de incubação, na presença / ausência do hormônio, foram detectadas por ELISA para ratos (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante. A insulina estática reflete o percentual de secreção de insulina sem a interferência das enzimas que degradam a insulina (IDE), também denominadas insulinasas (HUGILL; SHIMOMURA; COX, 2016). Portanto, em ensaios *in vitro*, a quantificação de insulina estática reproduz resultados mais fidedignos. O intervalo de concentrações de insulina detectado por este ensaio foi de 0,63 a 4,3 ng / mL. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios para insulina foram 3,22 e 6,95, respectivamente, com uma sensibilidade de 0,2 ng / mL. A insulina foi estimada por medidas colorimétricas a 450 nm, utilizando um leitor de placas ELISA (OrganonTeknika, Roseland, NJ, USA), por interpolação a partir de uma curva padrão. As amostras foram medidas em duplicata e os resultados foram expressos em ng de insulina por 15 ilhotas por poço (GOMES CASTRO et al., 2018).

3.4.4 Análise por Imunofluorescência

Os ratos foram divididos em dois grupos ($n = 5$), anestesiados com isoflurano e eutanasiados por guilhotina. O pâncreas de cada animal foi removido e incubado em tampão KRb HEPES por 30 min, na presença ou ausência de PD 98-059 (50 μ M). Após o tempo de pré-incubação, os tecidos foram incubados ou não (controle) com 1,25-D₃ (1 nM) em tampão KRb HEPES (O₂: CO₂ 95:5, v/v) por 1 h a 37 °C. Ao final da incubação, os tecidos foram inseridos em cassetes identificados e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, pH 7,3. Os tecidos foram desidratados em gradiente de etanol e então incluídos em parafina, para posteriormente serem fatiados em seções de 4 mm de espessura (MONTANYA; TÉLLEZ, 2009) e aderidos em lâminas de vidro. As lâminas foram então desparafinizadas em xilol, reidratadas em gradiente de etanol e enxaguadas em água da torneira. Após esta etapa, os tecidos foram contornados com caneta hidrofóbica Dakopen[®] e os locais de ligação inespecíficos foram bloqueados com PBS – BSA a 3% por 60 min a 4 °C. Os tecidos foram incubados por 12 h com anticorpos policlonais anti-insulina (1: 200) e anti-phosphoERK 1/2 (1: 500) diluídos em PBS – BSA 3% a 4 °C. Após algumas lavagens, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário IgG anti-rabbit conjugado ao Alexa Fluor 488, 647 diluídos (1: 1000) em PBS – BSA 3%, por 60 min em temperatura ambiente. Logo após, foram lavados com PBS e incubados com DAPI (GOMES CASTRO et al., 2014) por 10 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Os tecidos foram aderidos em lamínula com auxílio do reagente FluorSave. A coloração de controle foi realizada em lâminas seriais onde os anticorpos primários anti-insulina e anti-phosphoERK1/2 foram substituídos por PBS – BSA 3%. As imagens foram capturadas em digitalizador de lâminas Axio Scan com sistema de captura de imagens Zeiss Blue (Objetiva Plan-Apochromat 20x/0.8 M27; filtros de excitação e emissão vermelho: 653-668 nm, verde: 493-517 nm, azul: 353-465 nm) no Laboratório de Estudos de Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/CCB-UFSC). Para cada animal, 10 imagens em formato TIF das ilhotas pancreáticas (aumento de 40X) foram analisadas com o programa Image J 1.40 (Wayn Rasband, National Institutes of Health, USA). Para isso, os filtros azul e vermelho foram retirados das imagens coloridas em RGB (*red, green and blue* – 615x552 pixels, 32-bits), e as mesmas foram convertidas para escala de cinza (8-bits). Todas as condições de iluminação e aumento foram mantidas constantes.

3.4.5 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) ou em % do controle para três experimentos independentes. A análise de variância unidirecional seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ou teste *t* de Student não pareado foi usada para determinar se havia diferenças significativas entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4.4 METODOLOGIA *IN SILICO*

4.4.1 Perfil ADMET

Para avaliar descritores físico-químicos, propriedades farmacocinéticas, toxicidade, bem como a similaridade a fármaco (druglikeness) dos compostos químicos VDX (6-*s-trans*, PubChem CID: 5280453) e LUM (6-*s-cis*, ZINC39346450), foram utilizadas ferramentas de predições ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). As plataformas SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) e ADMETLab (<http://admet.scbdd.com>) foram empregadas para calcular os parâmetros descritos acima, aplicando métodos que incluem modelos de máquinas de vetores de suporte referenciados na literatura. Na base de dados ADMETLab, os SMILES de cada ligante foram aplicados na função WebServer (Avaliação Sistemática) (DONG et al., 2018).

No SwissADME, o arquivo .sdf de cada ligante foi inserido no campo de análise (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2014, 2017; DAINA; ZOETE, 2016).

4.4.2 Parceiras fisiológicas das proteínas-alvo

A base de dados STRING (SZKLARCZYK et al., 2011, 2015) foi empregado para prever possíveis interações proteína-proteína diretas (físicas) e indiretas (funcionais) relacionadas à sua funcionalidade (PANDEY; ARIFUZZAMAN, 2019).

As pesquisas por proteínas-chave de *Rattus norvegicus* foram realizadas a partir do link da página da Web UniProtKB (individualmente) ou inseridas manualmente (múltiplas proteínas) e analisadas pelas ferramentas do STRING.

Primeiramente, as proteínas-alvo inseridas manualmente na base de dados foram: ERp57, PRKCA (PKC), MAPK1 e MAPK3. Para otimizar o número de arestas e nós, foi necessário aplicar os parâmetros de baixa confiança (0,150) e 1ª camada e 2ª camada (não mais que 10 interações) considerando todas as fontes de interações ativas. Dados adicionais de proteínas parceiras para cada proteína-alvo foram investigados através do link da STRING disponível na página da Web UniProtKB. Assim, STRING calculou e gerou novos mapas de interações de proteínas considerando parâmetros padrão estabelecidos automaticamente (valores de confiança médios de até 0,400 com no máximo 5 interações na 1ª camada).

4.4.3 Estrutura dos ligantes

A estrutura molecular 3D do conformer 1,25-D₃ (6-*s-trans*; VDX) foi obtida a partir da entrada do PDB (PDB ID: 2ZLC) (SHIMIZU et al., 2008). O ligante foi isolado e minimizado (Dock prep) usando campo de força Amber ff99bsc0 no software UCSF Chimera, versão 1.14 (construção 42094). A estrutura da 1,25-D₃ na conformação 6-*s-cis* (LUM) foi obtida através do código Zinc12 (ZINC39346450; 3S,9R,10R,13R,14R,17S)-17-[(1S)-5-hidroxi-1,5-dimetilhexil]-10,13-dimetil-2,3,4,9,11,12,14,15,16; C₂₇H₄₄O₂) através de SMILES canônico (Simplified Molecular Input Line Entry Specification). Em seguida, os SMILES foram convertidos em um arquivo .mol2 (UCSF Chimera). Então, o conformer de menor energia gerado com o software Marvin Sketch (ChemAxon, versão 20.17.0) foi minimizado usando campo de força MMFF94 com o software OpenBabel (versão 3.1.1).

4.4.4 Modelo de homologia e Docking Molecular das proteínas-alvo

As estruturas cristalográficas das proteínas ERp57 e PKC foram geradas por modelos de homologia a partir da base de dados Swiss Model (disponível através do servidor web ExPasy). Inicialmente, a sequência FASTA da proteína ERp57 (*Rattus norvegicus*) foi obtida na base de dados UniProt Knowledgebase (UniProtKB; código P11598). Então, com base nesta sequência, a base de dados Swiss Model gerou um modelo de homologia para a estrutura da proteína com maior identidade (92,98%) comparativamente aos dados cristalográficos depositados no banco

de dados PDB (PDB: 3F8U) (DONG et al., 2009). É importante destacar que o receptor 1,25-D₃-MARRS foi identificado no banco de dados de proteínas (PDB) como ERp57. Por este motivo, esta última designação foi adotada. Enquanto que a estrutura da proteína PKC foi obtida a partir da sequência FASTA de rato disponível na UniProtKB (código P05696) (GUERRERO-VALERO et al., 2009). O modelo com 80,6% de similaridade com a estrutura cristalográfica da PKC depositado na PDB (3PFQ; Leonard et al. 2011) foi selecionada para os estudos *in silico*. A estrutura da proteína L-VDCC também foi obtida a partir da sequência FASTA de rato utilizando a base de dados mencionada (UniProtKB; código P22002) (FINDEISEN et al., 2017). O modelo com 70% de similaridade com a estrutura cristalográfica da L-VDCC depositada na PDB (5GJW) (WU et al., 2016) foi selecionada para os estudos *in silico*.

As simulações de docking proteína-ligante foram realizadas com a ferramenta AutoDock Vina / UCSF Chimera (versão 1.14) usando parâmetros padronizados (TROTT; OLSON, 2009). Em seguida, a posição prevista de cada ligante com o arquivo (.pdbqt) de valor de RMSD mais baixo e a proteína docada foram mesclados usando PyMOL (Molecular Graphics System Versão 2.3.0a0 Open Source) (WL, 2002) a fim de se obter o complexo 3D docado (.pdb) que foi visualizado com o software LigPlot⁺ 2.1 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Por fim, foram submetidos ao programa ACPYPE (SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012) usando a ferramenta AmberTools (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2013) para gerar a topologia usada nas simulações de dinâmica molecular (DM).

4.4.5 Dinâmica Molecular

As interações entre proteína e ligante foram previstas e analisadas por meio de simulações de dinâmica molecular (DMs). As posições iniciais dos ligantes para as DMs foram obtidas por meio de cálculos de *docking* molecular, conforme mencionado acima. A teoria funcional da densidade (DFT) foi utilizada nesta etapa para se obter parâmetros que foram utilizados para complementar a descrição da topologia dos ligantes, como carga parcial, ligações, ângulos conformacionais e diédricos dos ligantes. Esses parâmetros foram obtidos por meio de cálculos de campo autoconsistente (SCF) dentro da DFT usando o pacote do Sistema de Estrutura Eletrônica Molecular e Geral Atômico (GAMESS) (BARCA et al., 2020). Neste caso, o três parâmetros híbridos funcionais de Becke (Lee-Yang-Parr; B3LYP) (CANDIOTTO

et al., 2020) foram usados para o termo de correlação de troca em DFT, junto com um conjunto de base duplo zeta polarizado de valência dividida com base em orbitais do tipo Gaussiano (6-31G (d, p)) (DITCHFIELD; HEHRE; POPLE, 1971). O campo de força (FF) usado na descrição da proteína e dos ligantes foi AMBER99bsc1 e a topologia para todos os ligantes foi construída usando ACPYPE (SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012). Os cálculos de dinâmica molecular foram realizados durante 10 ns usando o pacote GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) (ABRAHAM et al., 2015) versão 2020.3 para Linux Kernel 5.4.0. Os sistemas estudados neste trabalho foram preparados de acordo com o protocolo estabelecido pelo Dr. Lemkul (LEMKUL, 2019), com algumas modificações. Adotou-se frame step de 2 ps e tempo de integração de 1 fs. O modelo de água TIP3P foi aplicado para descrever o complexo solvatado nas simulações (JORGENSEN et al., 1983). O sistema foi neutralizado e a energia minimizada com 50.000 passos do algoritmo de descida mais íngreme e posteriormente equilibrado. O equilíbrio foi realizado sob as constantes NVP (número de partículas, volume e temperatura) e NPT (número de partículas, volume e pressão) e (T = 300 K; P = 1 bar; 1 ns). As dinâmicas foram realizadas no conjunto NPT com pressão de referência (P) e temperatura (T) de 1 bar e 300 K, respectivamente. A temperatura foi mantida por um algoritmo de redimensionamento de velocidade (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007) com os graus de liberdade da proteína e do solvente separadamente acoplados a banhos de temperatura, com uma constante de acoplamento de 0,1 ps. O programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) foi usado para analisar os dados de DM, conforme publicado anteriormente (HSIN et al., 2008). Além disso, o script Python 2 "readHBmap.py" permitiu criar um mapa de existência de ligações de hidrogênio (<https://github.com/quytruong1808/vilas/blob/master/vilas/analyzer/readHBmap.py>). As trajetórias foram previstas pelo GROMACS com algoritmo Verlet baseado na busca de vizinhos, considerando condições periódicas de contorno de até 1,2 nm (12 Å) (LEMKUL, 2019). Além disso, GROMACS calculou as energias eletrostáticas e de van der Waals e a variação de energia livre de solvatação SASA (ΔG_{solv}) para os estados ligados formados pelo complexo proteína-ligante. Finalmente, o método da área superficial de Poisson-Boltzmann da Mecânica Molecular (MM-PBSA) permitiu obter informações adicionais sobre as energias de solvatação polares e não polares, bem como as energias eletrostáticas e de van der Waals (FARIAS et al., 2021). Os cálculos MM-PBSA foram realizados usando arquivos de trajetória e aplicando modelo de solvente explícito e parâmetros padronizados (KUMARI; KUMAR; LYNN, 2014). As visualizações das ligações de hidrogênio e das contribuições hidrofóbicas do complexo

proteína-ligante foram feitas com LigPlot⁺ 2.1 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). As superfícies eletrostáticas e hidrofóbicas foram visualizadas com o software PyMOL (versão 2.3.0) (WL, 2002).

4.4.6 Análise das cavidades

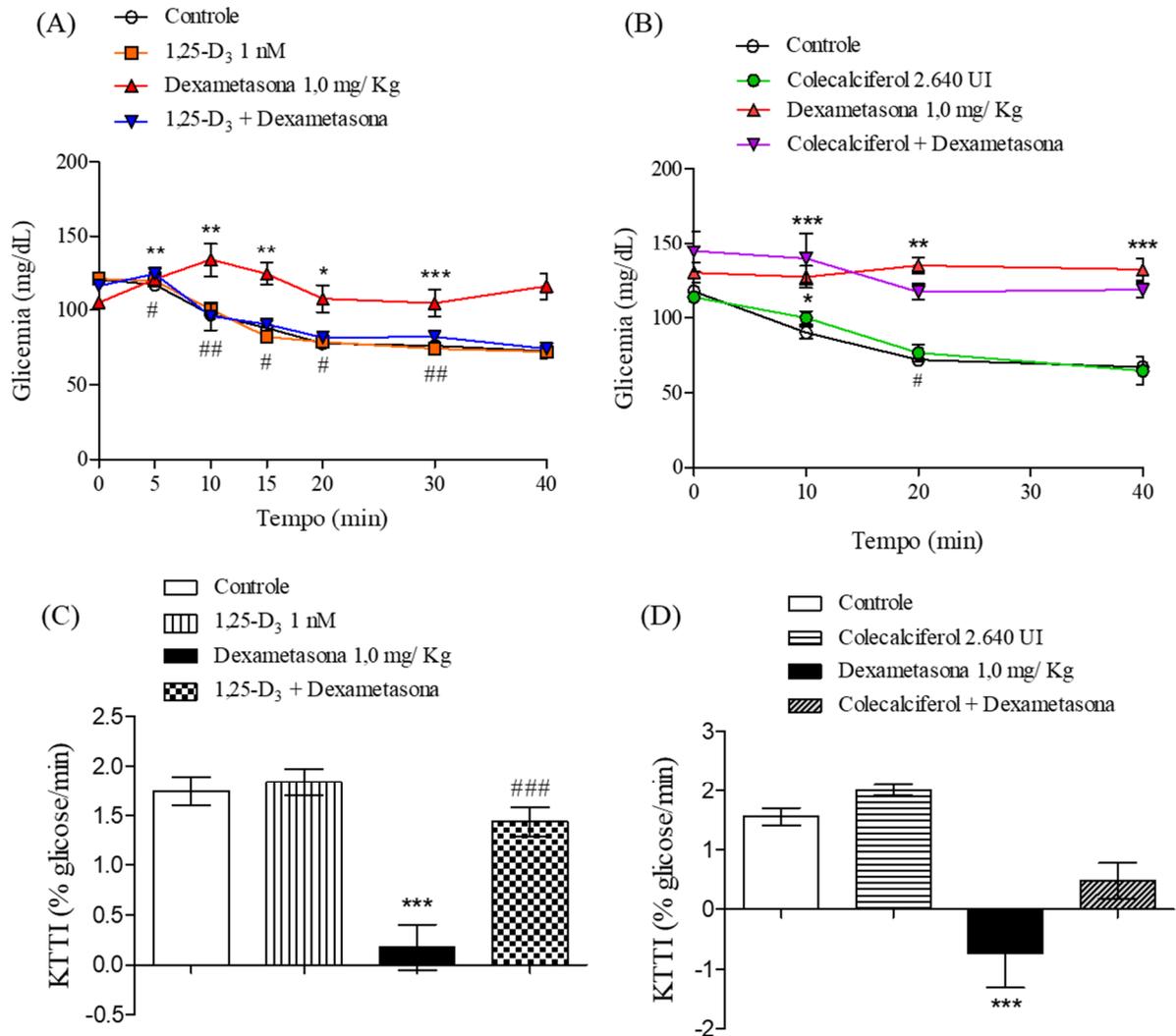
As cavidades foram estruturalmente analisadas usando o servidor web *ProteinsPlus* (FÄHRROLFES et al., 2017; SCHÖNING-STIERAND et al., 2020) e o programa UCSF Chimera (versão 1.14) (PETTERSEN et al., 2004). As ferramentas computacionais PoseView e DoGSiteScorer, ambas fornecidas pelo *ProteinsPlus*, foram empregadas para criar representações de pose 2D e calcular o drug score, bem como para prever dimensões, descritores de grupos funcionais e composição de aminoácidos, respectivamente, a fim de estimar a drugabilidade do composto.

5 RESULTADOS

5.1 TRATAMENTO *IN VIVO*

4.1.2 Efeito da 1,25-D₃ e do colecalciferol na resistência à insulina

No TTI, a dexametasona (1 mg/ Kg) induziu resistência à ação do hormônio insulina, evidenciada pelo aumento dos valores de glicose no sangue durante todo o período de teste (Fig. 10 A e 10 B). O tratamento com 1,25-D₃ (20 µg/ Kg, *i.p.*) foi capaz de reverter esse efeito, diminuindo os valores da curva glicêmica em ratos resistentes à insulina (Fig. 10 A). KTTI (Fig. 10 C) mostrou um aumento na constante de decaimento da glicemia de animais resistentes à insulina. No entanto, o tratamento com colecalciferol (2.640 UI, 1,8 mM, *v.o.*) não foi capaz de reproduzir efeito semelhante (Fig. 10 B). O colecalciferol não promoveu aumento no decaimento da glicose na glicemia de animais resistentes à insulina (Fig. 10 D). Os pesos corporais dos ratos tratados com 1,25-D₃, colecalciferol ou dexametasona permaneceram inalterados durante os 5 dias de tratamento (dados não mostrados).

FIGURA 10 – Perfil de ação da 1,25-D₃ e colecalciferol no teste de tolerância à insulina.

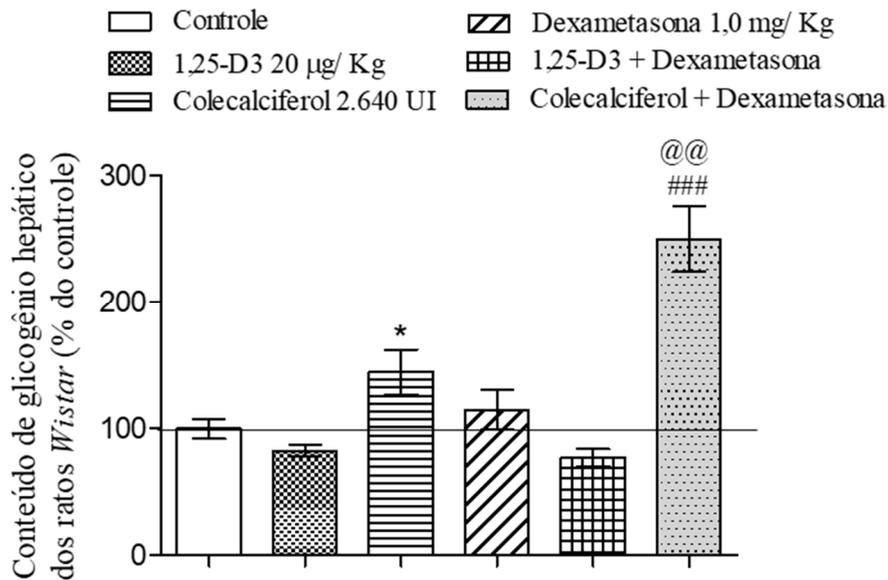
Efeito de A) 1,25-D₃ (N = 6) e B) colecalciferol (N = 8) no teste de tolerância à insulina (TTI). KTTI de C) ratos tratados com 1,25-D₃ e D) ratos tratados com colecalciferol. Os valores são expressos como média ± E.P.M.; ***p ≤ 0,001, **p ≤ 0,01 e *p ≤ 0,05, comparado com o grupo controle. ##p ≤ 0,001, ###p ≤ 0,01 e #p ≤ 0,05, comparado com o grupo dexametasona.

4.1.2 Conteúdo de glicogênio hepático

O tratamento com 1,25-D₃ não provocou alterações nas concentrações hepáticas de glicogênio nos grupos em estudo (Fig. 11). Por outro lado, o grupo que recebeu apenas

colecalfiferol (2.640 UI, 1.8 mM, *v.o.*) ou colecalfiferol e dexametasona por cinco dias consecutivos aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio hepático.

FIGURA 11 – Conteúdo de glicogênio hepático de ratos tratados com 1,25-D₃ e colecalfiferol.



Efeito do tratamento com 1,25-D₃ (20 µg/ Kg, *i.p.*) e com colecalfiferol (2.640 UI, *v.o.*) no conteúdo de glicogênio hepático. Os valores são expressos em % do controle; N = 6 (1,25-D₃); N = 8 (colecalfiferol). * $p \leq 0,05$, comparado com o grupo controle; @@ $p \leq 0,01$, comparado com o grupo colecalfiferol; ### $p \leq 0,001$, comparado com grupo dexametasona.

4.1.3 Efeito da 1,25-D₃ nas enzimas séricas, colesterol total, triacilglicerol e cálcio

Aos 40 min de teste de tolerância à insulina, o soro de ratos tratados com 1,25-D₃ foi coletado para quantificação de AST, ALT, LDH, γ -GT, para avaliar toxicidade hepática e para quantificação de CT, TG e cálcio, como descrito na tabela 1.

TABELA 1 – Influência da 1,25-D₃ nas enzimas séricas, CT, TG e cálcio, medidas ao final do teste de tolerância à insulina (40 min).

Análises bioquímicas	Controle	1,25-D ₃	Dexametasona	1,25-D ₃ + Dexametasona
AST (U/L)	58.75 ± 1.571	54.07 ± 5.975	38.27 ± 5.935	38.47 ± 1.282 [#]
ALT (U/L)	71.38 ± 9.089	66.00 ± 7.881	31.85 ± 1.470	40.75 ± 7.674 [#]

LDH (U/L)	722.1 ± 118.3	660.9 ± 45.26	556.7 ± 102.5	441.7 ± 26.17 ^{##}
γ-GT (U/L)	131.7 ± 1.327	125.0 ± 1.914	125.3 ± 0.7862	128.6 ± 1.336
CT (mg/dL)	135.3 ± 5.648	163.0 ± 9.562	112.9 ± 10.67	134.8 ± 7.738 [#]
TG (mg/dL)	113.3 ± 4.979	101.7 ± 2.706	192.2 ± 9.384 ^{***}	135.3 ± 5.711 ^{###}
Cálcio sérico (mg/dL)	10.24 ± 0.06628	10.19 ± 0.06900	11.40 ± 0.1776 ^{***}	11.49 ± 0.1708 ^{###}

Os valores são expressos como média ± E.P.M.; N = 6. ***p ≤ 0,001, comparado com o grupo controle; ###p ≤ 0,001, ##p ≤ 0,01 e #p ≤ 0,05, comparado com o grupo 1,25-D₃.

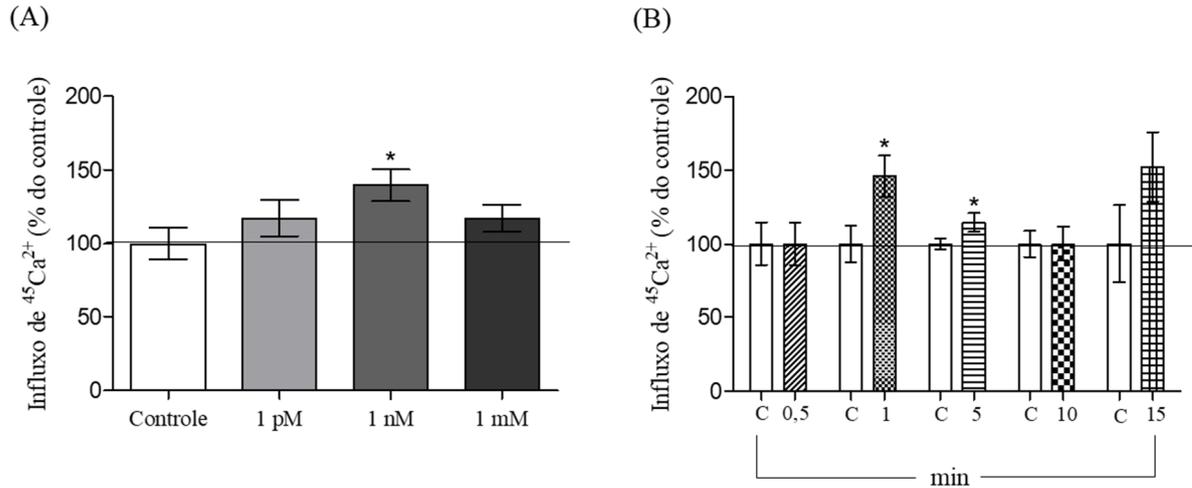
Os efeitos do tratamento com 1,25-D₃ em enzimas específicas, CT, TG e cálcio sérico são mostrados na Tabela 1. Reduções significativas foram observadas para as concentrações séricas de AST, ALT, LDH e CT no grupo resistente tratado com 1,25-D₃ quando comparado com o grupo normoglicêmico tratado com 1,25-D₃. As concentrações séricas de cálcio e TG aumentaram ao final do tratamento com 1,25-D₃. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de γ-GT entre os grupos antes e após o tratamento com 1,25-D₃, o que significa que a 1,25-D₃ não induz toxicidade hepática.

5.2 TRATAMENTO *IN VITRO*

5.2.1 Mecanismo de ação da 1,25-D₃ associado ao influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos

Após o equilíbrio de cálcio obtido com 60 min de incubação das ilhotas pancreáticas isoladas com ⁴⁵Ca²⁺, o influxo de ⁴⁵Ca²⁺ foi monitorado nos tempos: 0,5, 1, 5, 10 e 15 min; sem estímulo (controle) ou na presença de 1,25-D₃ (1 nM). O tratamento com 1,25-D₃ aumentou significativamente o influxo de ⁴⁵Ca²⁺ após 1 e 5 min de incubação (Fig. 12 A). O tempo de 1 min foi escolhido para as posteriores incubações. Em seguida, as ilhotas foram incubadas ou não, por 1 min, na presença da 1,25-D₃ nas concentrações de 1 pM, 1 nM e 1 mM (Fig. 12 B).

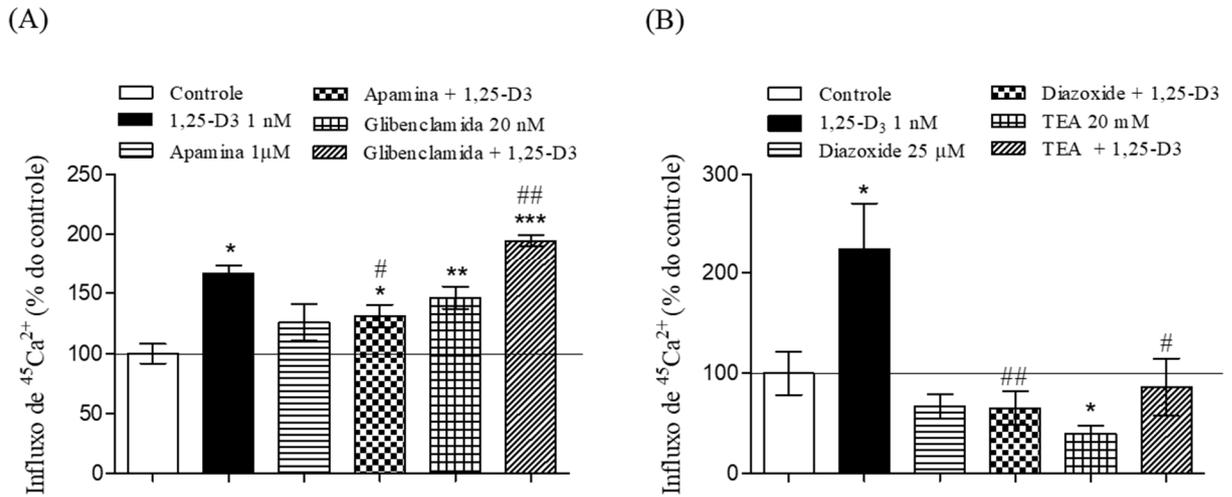
FIGURA 12 – Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas na presença de 1,25-D₃.



A) Curva concentração-resposta da 1,25-D₃ no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas. Pré-incubação: 60 min na presença de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 0,1 μCi / mL. Incubação: 1 min na presença de 1,25-D₃ e $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 0,1 μCi / mL. B) Curva-tempo da 1,25-D₃ (1 nM) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas. Pré-incubação: 60 min na presença de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 0,1 μCi / mL. Incubação: diferentes tempos na presença de 1,25-D₃ e $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 0,1 μCi / mL. C: controle para cada tempo. Os valores são expressos em % do controle; N = 6. *p \leq 0,05, comparado com o grupo controle.

O percentual estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas aumentou em 17% quando co-incubado com glibenclamida (20 nM), um bloqueador de canais de K⁺-ATP (Fig. 13 A), e diminuiu em cerca de 71% quando co-incubado com diazoxide (25 μM), um ativador dos canais de K⁺-ATP (Fig. 13 B), corroborando o envolvimento crucial destes canais para despolarização da membrana plasmática e abertura dos canais VDCC e aumento do influxo de cálcio. Além disso, quando co-incubado com o inibidor de canais de K⁺-Ca²⁺, apamina (1 μM), o efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi parcialmente bloqueado (21%), destacando o envolvimento desses canais no mecanismo de ação da 1,25-D₃ quando o [Ca²⁺] intracelular está aumentado. Foi investigado também o efeito da 1,25-D₃ no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ na presença de TEA (20 nM), um bloqueador de canais de K⁺ dependentes de voltagem (K_v). Como pode ser visto na Fig. 10B, o TEA *per se* diminuiu o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 82%, e quando co-incubado com o hormônio, anulou o efeito da 1,25-D₃ em 62%, evidenciando a participação destes canais para a repolarização celular.

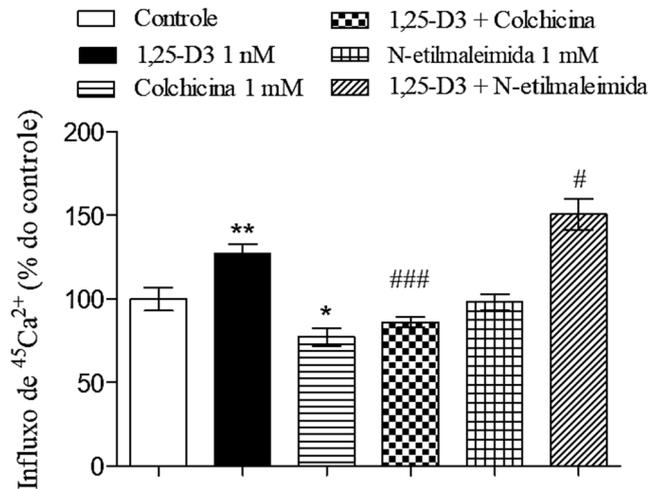
FIGURA 13 – Participação dos canais de potássio no efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas isoladas.



Participação dos canais A) K⁺-Ca²⁺ e K⁺-ATP e B) K⁺-ATP e Kv no efeito estimulatório da 1,25-D₃. Pré-incubação: 60 min na presença de ⁴⁵Ca²⁺ 0,1 μCi / mL. Incubação: 1 min na presença de 1,25-D₃ e ⁴⁵Ca²⁺ 0,1 μCi / mL. Os valores são expressos em % do controle; N = 6. ***p ≤ 0,001, **p ≤ 0,01 e *p ≤ 0,05, comparado com o grupo controle; ##p ≤ 0,01 e #p ≤ 0,05, comparado com o grupo 1,25-D₃.

A colchicina, um agente despolimerizador de microtúbulos foi utilizada para avaliar se o mecanismo de ação do 1,25-D₃ poderia ser influenciado por distúrbios na integridade do citoesqueleto celular. A colchicina reduziu o influxo basal de ⁴⁵Ca²⁺ em 67% e quando co-incubada com o hormônio 1,25-D₃ este, não foi suficiente para reverter a diminuição no influxo de cálcio. Quando a adesão vesicular foi bloqueada pela *N*-etilmaleimida (1 mM), o efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos aumentou em cerca de 20% (Figura 11), sugerindo que o as ações do hormônio podem ser mediadas por processos de fusão e secreção dos grânulos de insulina.

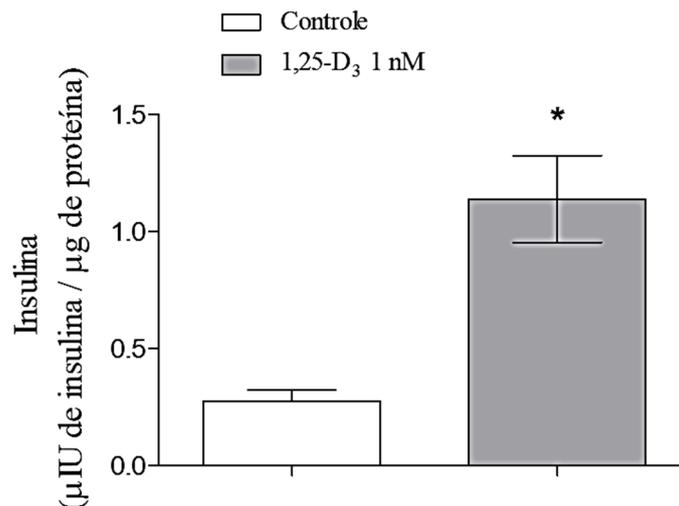
FIGURA 14 – Papel do transporte vesicular e dos microtúbulos no efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas isoladas.



Pré-incubação: 60 min na presença de ⁴⁵Ca²⁺ 0,1 μCi / mL. Incubação: 1 min na presença de 1,25-D₃ e ⁴⁵Ca²⁺ 0,1 μCi / mL. Os valores são expressos em % do controle; N = 6. **p ≤ 0,01 e *p ≤ 0,05, comparado com o grupo controle; ###p ≤ 0,001 e #p ≤ 0,05, comparado com o grupo 1,25-D₃.

A figura 15 mostra o efeito da 1,25-D₃ na secreção de insulina estática em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos. O efeito estimulatório do composto na secreção de insulina foi de aproximadamente 314%, em comparação com a secreção basal de insulina.

FIGURA 15 – Efeito estimulatório da 1,25-D₃ na secreção de insulina estática.

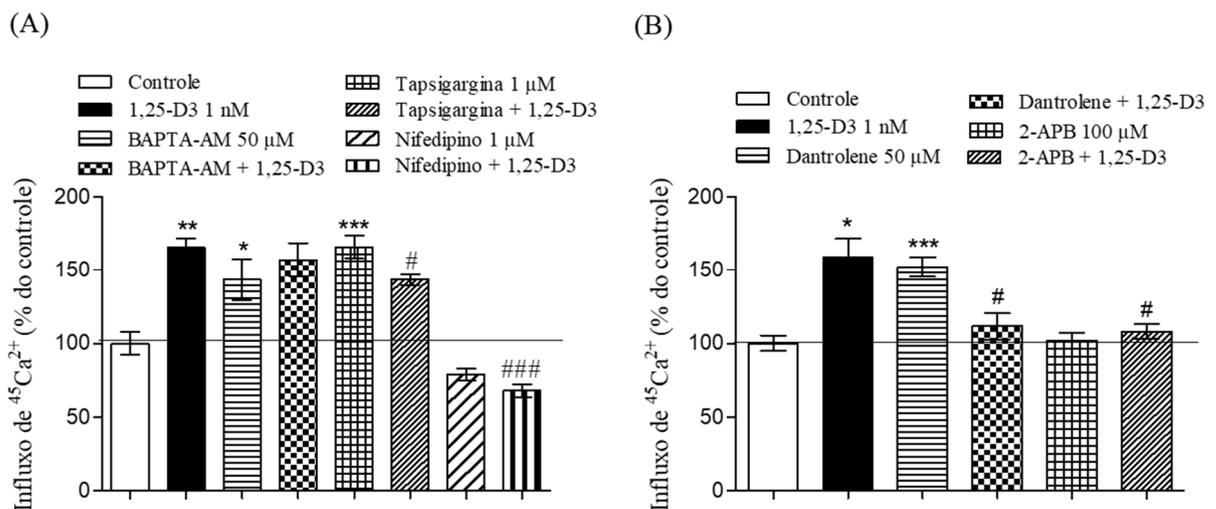


Efeito da 1,25-D₃ na secreção de insulina estática em ilhotas pancreáticas isoladas. Tempo de incubação: 10 min. Os valores são expressos em % do controle; N = 6. *p ≤ 0,05, comparado com o grupo controle.

A influência do cálcio intracelular no efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ foi investigada usando BAPTA-AM (50 μM), um quelante de cálcio intracelular. Foi

observado que assim como a 1,25-D₃, o BAPTA-AM aumentou o influxo basal de ⁴⁵Ca²⁺ em 44%. No entanto, quando co-incubado com BAPTA-AM, o efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ não foi alterado (Fig. 16 A). Quando a bomba SERCA foi inibida pela tapsigargina (1 μM), a 1,25-D₃ não foi capaz de estimular o influxo de ⁴⁵Ca²⁺, sugerindo que ação deste hormônio requer a participação do cálcio oriundo do RE. Para verificar a participação dos L-VDCCs no mecanismo de ação envolvido no efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺, foi utilizado o inibidor nifedipino (1 μM). Foi observado que a nifedipina não alterou o influxo basal de ⁴⁵Ca²⁺, no entanto, inibiu o efeito estimulatório da 1,25-D₃ em 59% (Fig. 16 A). Quando o inibidor dantrolene (50 μM) foi usado para bloquear os receptores de rianodina (RZR), houve uma diminuição parcial no efeito da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em cerca de 30%, bem como com o 2-APB (100 μM), um antagonista dos receptores IP₃, com 32% de diminuição (Fig. 16 B), demonstrando a participação do cálcio dos compartimentos (RE) no mecanismo de ação da 1,25-D₃.

FIGURA 16 – Participação do cálcio extra e intracelular no efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas isoladas.

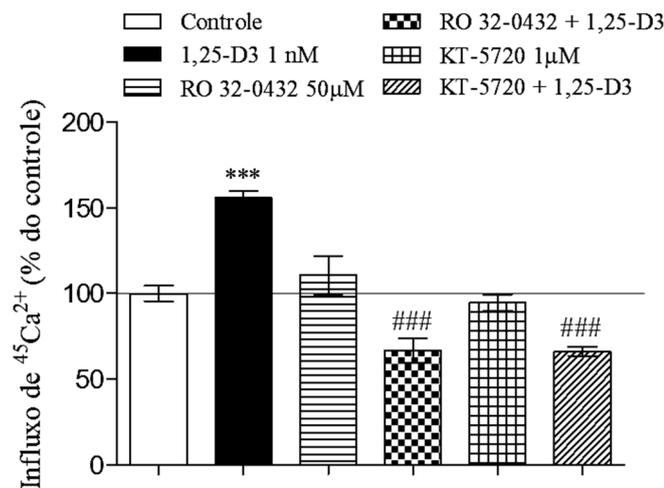


Participação do A) cálcio intracelular, bomba SERCA, VDCC e B) dos receptores RZR e IP₃. Pré-incubação: 60 min na presença de ⁴⁵Ca²⁺ 0,1 μCi / mL. Incubação: 1 min na presença de 1,25-D₃ e ⁴⁵Ca²⁺ 0,1 μCi / mL. Os valores são expressos em % do controle; N = 6. ***p ≤ 0,001, **p ≤ 0,01 e *p ≤ 0,05, comparado com o grupo controle; ###p ≤ 0,001, #p ≤ 0,05, comparado com o grupo 1,25-D₃.

Alvos intracelulares que medeiam os efeitos da 1,25-D₃ no influxo de ⁴⁵Ca²⁺ também foram estudados, assim como a participação de PKC e PKA (Fig. 17). Quando RO 32-0432 (50

μM), um inibidor de PKC convencional (dependente de cálcio) e KT-5720 ($1 \mu\text{M}$), um inibidor de PKA, foram utilizados, o efeito da $1,25\text{-D}_3$ foi reduzido em aproximadamente 57%, respectivamente, indicando que estas proteínas cinases estão envolvidas na via de sinalização da $1,25\text{-D}_3$.

FIGURA 17 – Participação da PKC e PKA no efeito estimulatório da $1,25\text{-D}_3$ no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas.



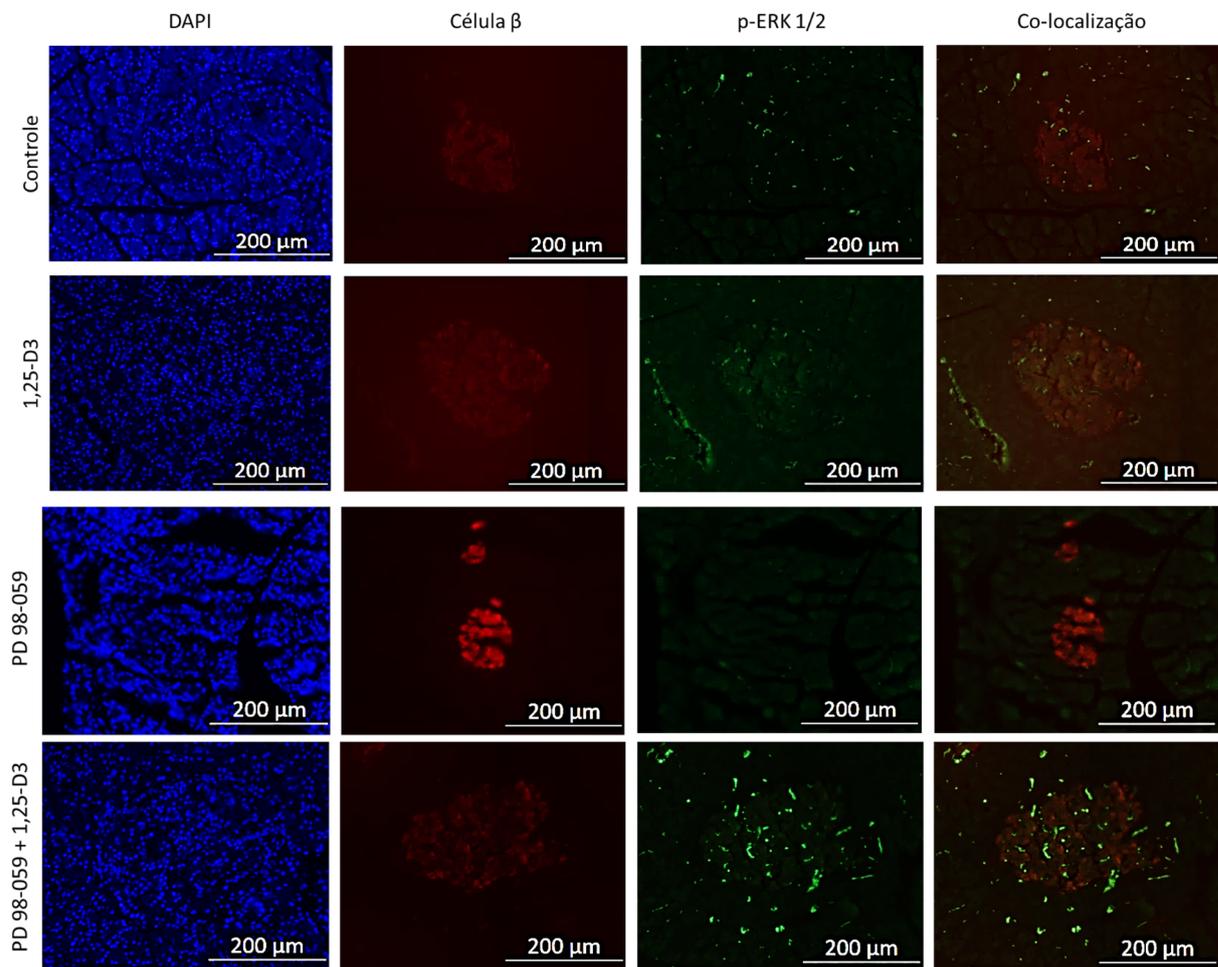
Pré-incubação: 60 min na presença de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ $0,1 \mu\text{Ci} / \text{mL}$. Incubação: 1 min na presença de $1,25\text{-D}_3$ e $^{45}\text{Ca}^{2+}$ $0,1 \mu\text{Ci} / \text{mL}$. Os valores são expressos em % do controle; N = 6. *** $p \leq 0,001$, comparado com o grupo controle; ### $p \leq 0,001$, comparado com o grupo $1,25\text{-D}_3$.

5.2.2 Efeito da $1,25\text{-D}_3$ no imunoconteúdo da proteína cinase MAPK/ERK1/2 fosforilada (p-erk 1/2) em ilhotas pancreáticas de ratos.

O tratamento *in vitro* com $1,25\text{-D}_3$ (1 nM) estimulou um aumento da fluorescência de p-ERK1/2 em ilhotas pancreáticas de ratos normoglicêmicos em aproximadamente 57% (Fig. 18). O inibidor de MAPK/ERK1/2, PD 98-059 diminuiu o imunoconteúdo de p-ERK 1/2, porém, quando co-incubado com $1,25\text{-D}_3$, o efeito estimulatório do hormônio na fosforilação das proteínas ERK1/2 aumentou em 46%. A Figura 18 representa as imagens de imunofluorescência de fatias do pâncreas de ratos tratados *in vitro* na ausência (controle) ou presença de $1,25\text{-D}_3$ (1 nM), e/ou do inibidor PD 98-059 ($50 \mu\text{M}$).

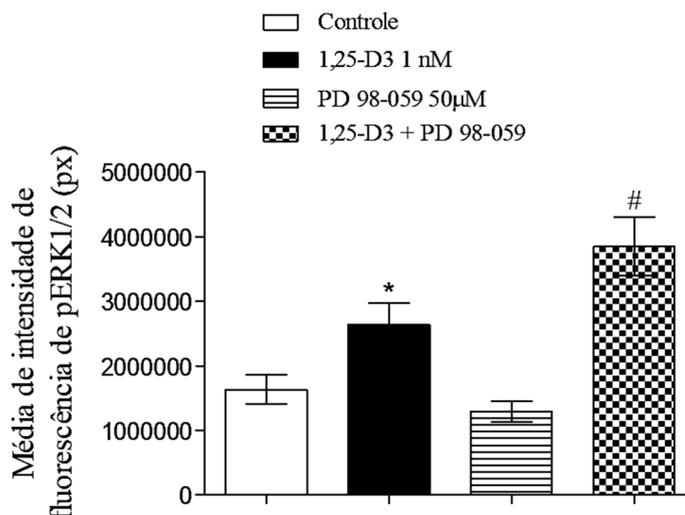
FIGURA 18 – Efeito da $1,25\text{-D}_3$ no imunoconteúdo de p-ERK1/2 na presença de PD 98-059 em pâncreas de ratos após tratamento *in vitro*.

A)



A) Imunolocalização de p-ERK1/2 em células β pancreáticas de ratos. Microscopia de imunofluorescência de fatias de pâncreas de ratos tratados com 1,25-D₃ (1 nM) *in vitro* na ausência (controle) ou presença de PD 98-059 (50 μ M) (20X). PD 98-059 foi adicionado ao meio durante o período de pré-incubação (30 min). Incubação: 60 min. Os grânulos de insulina foram marcados com Alexa Fluor 647 (vermelho). p-ERK1/2 foi marcada com Alexa Fluor 488 (verde). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

B)



B) Média de intensidade de fluorescência de p-ERK1/2. Os valores são expressos em E.P.M.; N = 3. * $p \leq 0,05$, comparado com o grupo controle; # $p \leq 0,05$, comparado com o grupo 1,25-D₃.

5.3 ESTUDOS *IN SILICO*

5.3.1 Predições do perfil ADMET

Os compostos VDX e LUM foram avaliados de acordo com suas predições ADMET (Tabela 2) através das plataformas SwissADME e ADMETLab. Como esperado, as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas preditas foram semelhantes aos dados relatados quando um software equivalente foi aplicado (DEB; REEVES; LAFORTUNE, 2020). A importância das propriedades físico-químicas e características estruturais de um composto se reflete no controle do metabolismo. Além disso, esses parâmetros também afetam o transporte das moléculas VDX e LUM através das membranas plasmáticas. É importante ressaltar que eles refletem em parâmetros farmacocinéticos, como a concentração plasmática e a meia-vida do fármaco (GAD, 2008). Curiosamente, embora a molécula já seja usada clinicamente por décadas, informações relativas as propriedades físico-químicas dos derivados da vitamina D₃ ainda são limitados na literatura. Similarmente, tanto LUM quanto VDX predisseram moderada a fraca solubilidade em água em pH neutro ($\log S$). Cabe ressaltar que a solubilidade em água é prevista pelo número de grupos hidroxila na estrutura química. Assim, quanto maior o número de grupamentos hidroxila na estrutura, mais solúvel é o composto. Desta forma, ambos os compostos são considerados predominantemente lipofílicos com características estruturais

hidrofóbicas ($\log P > 5$) correlacionadas ao precursor, a molécula de colesterol (JONES, 2008). De fato, a solubilidade predita para VDX e LUM é inversamente relacionada aos respectivos valores de $\log P$, conforme relatado anteriormente para derivados da vitamina D₃ (DEB; REEVES; LAFORTUNE, 2020). Além disso, ambos os valores de $\log P$ refletem na lipofilicidade e, conseqüentemente, contribuem para maior valor de absorção gastrointestinal previsto para LUM (90,4%) quando comparado ao VDX (78,2%) (Tabela 2) (GAD, 2008). No entanto, os valores de coeficiente de distribuição D previstos para LUM e VDX refletem na alta permeabilidade de ambos os compostos, independentemente dos valores de volume de distribuição subóticos, indicativos de alta afinidade por proteínas de ligação plasmáticas. Além disso, tanto LUM quanto VDX são moléculas que apresentam metabolismo moderado a alto ($\log D_{pH7.4}$) (Tabela 2). É importante ressaltar que o coeficiente de difusão tem um papel farmacocinético fundamental que representa a capacidade molecular de cruzar passivamente as bicamadas lipídicas (TSIMPANOIANNIS et al., 2019).

Uma menor área de superfície topológica polar (TPSA) prevista para LUM (40,46 Å²), comparativamente ao VDX, poderia ser explicada pela ausência de um grupo hidroxila na posição C-1. Além disso, um valor mais baixo da área de superfície polar e o valor $\log P$ mais alto (6,424) para LUM determinam a probabilidade de cruzar a barreira hematoencefálica (Tabela 2). Além disso, os valores de TPSA estão inversamente relacionados à absorção intestinal, o que poderia explicar maior absorção intestinal para o composto LUM (90,4%) em relação ao VDX (78,2%) (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000).

Em relação à drugabilidade (semelhança à fármaco), a base de dados SwissADME aplica cinco critérios disponíveis (Lipinski, Ghose, Veber, Egan, Muegge) para considerar a chance de uma molécula se tornar um medicamento oral no que diz respeito à biodisponibilidade. Assim, ambos os compostos (LUM e VDX) apresentaram 1 violação das regras de Lipinski (Peso molecular (MW) ≤ 500), sendo considerados, no entanto, compostos semelhantes a fármacos. Por outro lado, LUM e VDX não podem ser considerados candidatos a medicamentos orais de acordo com os critérios de Ghose e Muegge devido a 2 violações ($160 \leq MW \leq 480$ e $40 \leq \text{Refração molar} \leq 130$) e 1 violação ($200 \leq MW \leq 600$, ligações rotativas ≤ 15 , $XLOGP3 > 5$) respectivamente. Além disso, LUM apresentou 1 violação ($WLOG > 5,88$) de acordo com as regras de Egan.

De acordo com as propriedades farmacocinéticas, apenas VDX promove a inibição do CYP3A4 (Tabela 2). O CYP3A4 é expresso principalmente no fígado e pertence à família de enzimas do citocromo P450. CYP3A4 é uma das enzimas mais importantes no metabolismo de fármacos e conseqüentemente, sua inibição pode estender o efeito de alguns medicamentos e gerar acúmulo nos tecidos e toxicidade. Além disso, foi relatado que o CYP3A4 pode regular o metabolismo da vitamina D, assim como a vitamina D pode regular a expressão do CYP3A4. Assim, esta enzima pode estar envolvida na biotransformação e depuração da 1,25-D₃ quando se considera a interação do VDX e dos respectivos metabólitos. Por outro lado, 1,25-D₃ poderia estimular a transcrição de CYP3A4 (WANG et al., 2013).

Surpreendentemente, LUM apresentou melhor perfil farmacocinético, principalmente devido ao menor nível de hepatotoxicidade (52,6%) e menor toxicidade oral aguda (LD50 = 138,281 mg/ Kg) quando comparado ao VDX (90%; 3,466 mg/ Kg). É importante ressaltar que a concentração usada para os experimentos *in vitro* foi significativamente inferior ao limite de toxicidade para 1,25-D₃ (1nM, 42 µg/ Kg). Embora, relatos na literatura ainda garantem alguns efeitos protetores da vitamina D₃ no tecido hepático (ALMASMOUM et al., 2019).

Embora raro, a ingestão oral excessiva de vitamina D₃ pode levar à toxicidade. A principal consequência da hipervitaminose D é o aumento da concentração de cálcio na corrente sanguínea (hipercalcemia). Assim, a hipercalcemia é um efeito adverso importante no uso da vitamina D₃ como terapia medicamentosa e se deve ter cautela na dosagem (DEB; REEVES; LAFORTUNE, 2020).

TABELA 2 – Predições ADMET calculadas pelas bases de dados SwissADME and ADMETLab*.

Propriedades físico-químicas	Lipofilicidade (Log P)		Violações de semelhanças a drogas		Solubilidade (Log S)						
	VDX	LUM	VDX	LUM	VDX	LUM	VDX	LUM			
Peso molecular	416.64	400.64	iLOGP	4.25	4.52	Lipinski	1	1	ESOL	-5.22	-5.89
Ligações rotacionáveis	6	5	XLOGP3	5.07	6.19	Ghose	2	2	Ali	-6.09	-6.82
Aceptores	3	2	WLOGP	5.70	6.42	Veber	0	0	SILICOS-IT	-4.60	-5.17
Doadores	3	2	MLOGP	4.33	5.30	Egan	0	1	Log S*	-6.31	-6.28
Refratividade Molar	127.40	124.34	SILICOS-IT	5.81	5.62	Muegge	1	1			
TPSA (Å ²)	60.69	40.46	Consenso	5.03	5.61	Pontuação de Biodisponibilidade	0.55	0.55			
Farmacocinética											
	VDX	LUM		VDX	LUM		VDX	LUM		VDX	LUM
Log D _{pH7.4} *	4.17	4.42	Absorção GI	High	High	Inibidor CYP1A2	Não	Não	Cl(mL/min/kg)*	0.81	1.47
VD (L/kg) *	-0.35	-0.01	Permeabilidade			Inibidor CYP2C19	Não	Não	HIA*	78.2	90.4
PPB*	97.43	85.04	BHE	Não	Não	Inibidor CYP2C9	Não	Não			
T(½) (h)*	1.97	1.94	Substrato P-gp	Não	Não	Inibidor CYP2D6	Não	Não			
						Inibidor CYP3A4	Sim	Não			
Toxicidade											
	VDX				LUM						
	Categoria		Probabilidade		Categoria		Probabilidade				
Hepatotoxicidade*	3		0.900		1		0.526				
LD50 (mg/kg) ² *	-		3.466		-		138.28				
DILI	0		0.256		0		0.204				
FDAMDD	0		0.03		0		0.31				

TPSA, Área de superfície polar topológica; Log DpH7.4, Coeficiente de distribuição (3 a 5: Solubilidade baixa; Permeabilidade alta; Metabolismo moderado a alto); VD, Volume de distribuição; PPB, Ligação à proteína plasmática; T (½), Tempo de meia-vida; GI, Gastrointestinal; BBB, Barreira hematoencefálica; P-gp, Glicoproteína-P; Cl, Clearance; HIA, Absorção intestinal humana; LD50, Dose letal média; DILI, Lesão hepática induzida por drogas; FDAMDD, dose diária máxima recomendada.

5.3.2 Parceiras fisiológicas

No início da pesquisa, a base de dados STRING atribuiu a todas as proteínas-chave (ERp57, MAPK1, MAPK3 e PKC) o gene que codifica cada uma delas (Pdia3, Mapk1, Mapk3 e Prkca, respectivamente). As análises realizadas com as entradas de múltiplas proteínas inseridas manualmente complementaram os resultados gerados pela STRING através do link da UniProtKB. A Tabela 3 resume os dados da STRING para as proteínas-chave (Nó 1) e suas parceiras fisiológicas (Nó 2) vindas da UniProtKB ou inseridas manualmente.

TABELA 3 – Parceiras fisiológicas (interação proteína-proteína) preditas pela STRING.

Identificação (UniProtKB)	Abreviação	Código Nó 1	Código Nó 2	
			UniProtKB (score combinado)	Inserido manualmente (score combinado)
Proteína quinase 3 ativada por mitógeno	MAPK3/ERK1	Mapk3	Mapk1 (0.977)	PKC/Prkca (0.906)
			Map2k1 (0.971)	ERp57/Pdia3 (0.230)
			Raf1 (0.958)	
Proteína quinase 1 ativada por mitógeno	MAPK1/ERK2	Mapk1	Mapk3 (0.977)	PKC/Prkca (0.904)
			Map2k1 (0.971)	
			Raf1 (0.957)	
Proteína dissulfeto- isomerase A3	ERp57	Pdia3	Calr (0.999)	
			Canx (0.974)	ERK1/Mapk3/MAPK3 (0.230)
			Hsp90b1 (0.973)	PKC/Prkca (0.204)
			Hspa5 (0.953)	
			Tapbp (0.967)	
Proteína quinase C tipo alfa	PKC	Prkca	Pick1 (0.987)	ERK1/Mapk3/MAPK3 (0.906)
			Akap5 (0.985)	ERK2/Mapk1/MAPK1 (0.904)
			Sdc4 (0.975)	
				ERp57/Pdia3 (0.204)

Mapk1, proteína quinase 1 ativada por mitógeno; Map2k1, proteína quinase 1 ativada por mitógeno de especificidade dupla; Raf1, proto-oncogene serina / treonina-proteína quinase RAF; Mapk3, proteína quinase 3 ativada por mitógeno; Pdia3, família A3 da proteína dissulfeto isomerase; Calr, Calreticulina; Canx, Calnexina; Hsp90b1, Endoplasmína; Hspa5, proteína regulada por glicose de 78 kDa; Tapbp, proteína de ligação a tapbp; Prkca, proteína quinase C tipo alfa; Pick1, proteína de ligação do tipo proteína quinase C alfa; Akap5, proteína âncora de A-quinase 5; Sdc4, Syndecan-4; Cacna1c, subunidade alfa-1C do canal de cálcio do tipo L dependente de voltagem; Calm1, Calmodulina-1; Cacnb1, subunidade beta-1 do canal de cálcio do tipo L dependente de voltagem; Cacna2d1, subunidade alfa-2 / delta-1 do canal de cálcio dependente de voltagem; Cacnb4, subunidade beta-4 do canal de cálcio do tipo L dependente de voltagem.

É importante destacar que a STRING mudou a nomenclatura de MAPK/ERK1/2 para MAPK3/ERK1 e MAPK1/ERK2 (Tabela 3). MAPK1/ERK2 (Mapk1) e MAPK3/ERK1 (Mapk3) desempenham papéis cruciais na cascata de sinalização MAPK/ERK na fisiologia das células β (KHOO et al., 2003).

Redes de parceiras fisiológicas mostraram interações inesperadas entre chaperonas (Hsp90b1, Hspa5) e ERp57. As chaperonas formam complexos no ER, e estão associadas ao dobramento e controle de qualidade de glicoproteínas recentemente sintetizadas. Além disso, o transporte e a externalização de proteínas feitos através da Tapbp (proteína de ligação a tapbp) complexada com calreticulina e ERp57 permitem respostas celulares não genômicas após estímulo externo (PADARIYA et al., 2020).

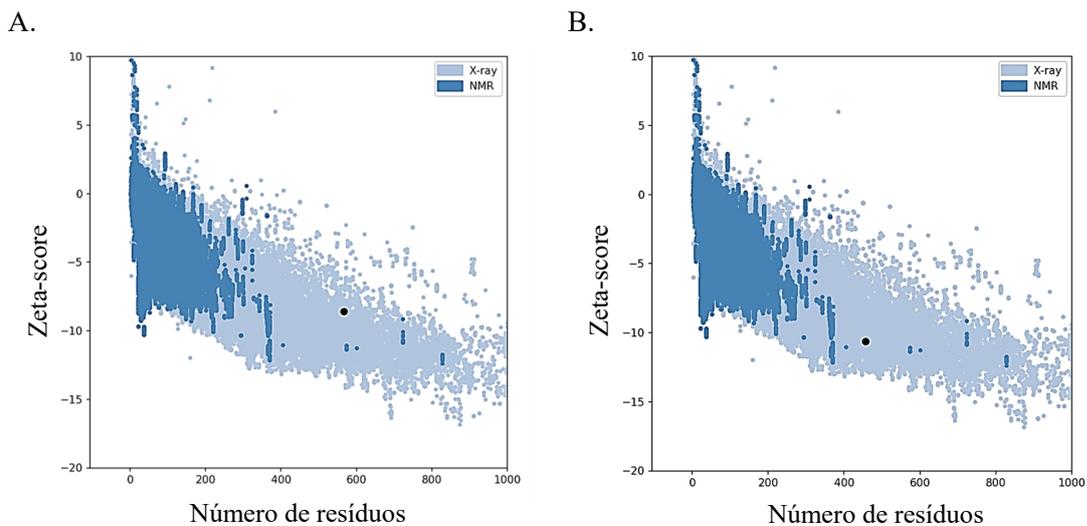
Os mapas de interações mostraram arestas da PKC conectadas através de nós com Pick1 (proteína de ligação a PRKCA, pontuação 0,987), Akap5 (proteína âncora de quinase A 5, pontuação 0,985) e Sdc4 (Syndecan-4, pontuação 0,975), um ativador de PKC (LIM et al., 2003) (Tabela 3). Curiosamente, a literatura relata que Pick1 protege as células β pancreáticas contra danos estimulados por glicose elevada, por meio da sinalização PI3K / Akt. Além disso, Pick1 atua estimulando a secreção de insulina e inibindo a progressão do diabetes (QIU; MA; FENG, 2020).

É importante destacar que as vias de sinalização induzidas por PKC e PKA (proteína quinase dependente de cAMP) são direcionadas ao ambiente intracelular após a interação de proteínas de ancoragem de quinase A (Akap) (SAMELSON et al., 2015). Além disso, as interações PKC-Akap5 e PKA-Akap5 modulam o canal de cálcio do tipo L (L-VDCC) após sua fosforilação por PKA, na qual foi observado *in vitro* sob aumento de glicose extracelular (PRADA et al., 2020).

5.3.3 Qualidade dos modelos gerados

A pontuação zeta adequada prevista pelo servidor da web ProSA garantiu a qualidade de ambos os modelos (- 10.64, ERp57; - 8.61, PKC; Fig. 19) (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

FIGURA 19 - Zeta-score geral que garante a qualidade dos modelos ERp57 (A) e PKC (B) preditos pela base de dados ProSa-web (proteína modelada).



5.3.4 Interações proteína-ligante referentes à Dinâmica Molecular (DM)

As análises foram realizadas usando os ligantes LUM e VDX e considerando os resultados obtidos para cada proteína. Esses resultados foram preditos após simulação de 10 ns. Frames com ligações de hidrogênio (H-bonds) preditas nas simulações de DM foram selecionados para análises adicionais de interações entre resíduos de aminoácidos das proteínas ERp57 e PKC e os ligantes LUM e VDX. Informações complementares sobre as interações proteína-ligantes preditas pelas ferramentas PoseView, UCSF Chimera e LigPlot⁺ mostraram ligações de hidrogênio adicionais e contribuições hidrofóbicas (Tabela 4).

TABELA 4 – Resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações proteína-ligante previstas para cada frame com o auxílio das ferramentas PoseView, UCSF Chimera e LigPlot⁺.

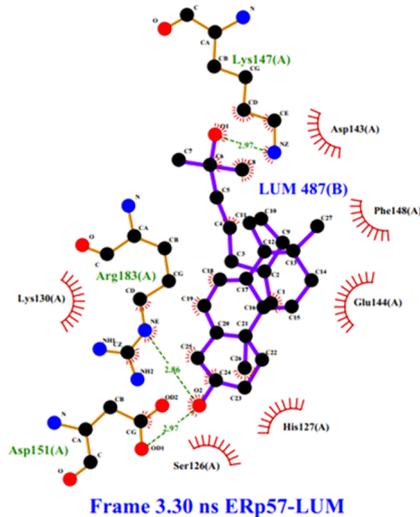
Proteína-ligante (frame, ns)	Localização	Ligações de hidrogênio				Interações hidrofóbicas
		Polares			Apolares	
		Neutros	Positivos	Negativos		
ERp57 – LUM (3.30)	PoseView	-	Lys ¹⁴⁷	Asp ¹⁵¹	-	Glu ¹⁴⁴ , Lys ¹⁴⁷
	Chimera	-	Lys ¹⁴⁷ , Arg ¹⁸³	Asp ¹⁵¹	-	NA
	LigPlot ⁺	-	Lys ¹⁴⁷ , Arg ¹⁸³	Asp ¹⁵¹	-	Ser ¹²⁶ , His ¹²⁷ , Lys ¹³⁰ , Asp ¹⁴³ , Glu ¹⁴⁴ , Lys ¹⁴⁷ , Phe ¹⁴⁸ , Asp ¹⁵¹ , Arg ¹⁸³
ERp57 – VDX (5.85)	PoseView	-	His ¹²⁷	Glu ¹⁴⁴	-	Ser ¹²⁶
	Chimera	-	His ¹²⁷	Glu ¹⁴⁴	-	NA
	LigPlot ⁺	-	His ¹²⁷	Glu ¹⁴⁴	-	Pro ¹¹⁸ , Ser ¹²⁶ , His ¹²⁷ , Val ¹³⁷ , Leu ¹³⁹ , Lys ¹⁴⁷ , Phe ¹⁴⁸
PKC – LUM (4.55)	PoseView	Asn ⁶²⁵	-	-	-	Met ⁴⁷⁰
	Chimera	Asn ⁶²⁵	-	-	-	NA
	LigPlot ⁺	Asn ⁶²⁵	-	-	-	Leu ¹²⁵ , Leu ³⁴⁵ , Val ³⁵³ , Tyr ⁴¹⁹ , Val ⁴²⁰ , Gly ⁴²³ , Asp ⁴²⁴ , Met ⁴⁷⁰ , Asn ⁶²⁵ , Phe ⁶²⁶ , Phe ⁶³⁰
PKC – VDX (1.20)	PoseView	Asn ⁴⁶⁸	Lys ³⁴⁷	-	-	Ile ¹²⁶ , Lys ³⁴⁷ , Met ⁴⁷⁰ , Phe ⁶²⁹
	Chimera	Asn ⁴⁶⁸	Lys ³⁴⁷	-	-	NA
	LigPlot ⁺	Asn ⁴⁶⁸	Lys ³⁴⁷	-	-	Leu ¹²⁵ , Ile ¹²⁶ , Leu ³⁴⁵ , Gly ³⁴⁶ , Lys ³⁴⁷ , Val ³⁵³ , Val ⁴²⁰ , Asn ⁴²¹ , Gly ⁴²³ , Tyr ⁴²⁷ , Asp ⁴⁶⁷ , Asn ⁴⁶⁸ , Met ⁴⁷⁰ , Phe ⁶²⁶ , Phe ⁶²⁹

5.3.4.1 ERp57

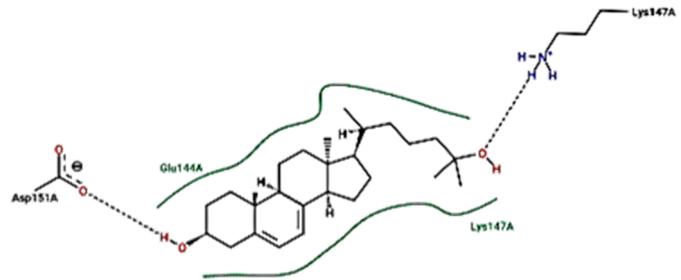
Os resíduos de aminoácidos com as maiores taxas de ocupação no mapa de existência de ligações de hidrogênio (H bonds) foram selecionados para ERp57 - VDX (frame 5,85 ns) e para ERp57 - LUM (frame 3,30 ns).

FIGURA 20 – Ligações de hidrogênio e contribuições hidrofóbicas previstas pelas ferramentas A) LigPlot⁺ e B) PoseView entre ERp57 e LUM. C) Mapa de existência de ligações de hidrogênio previstas na DM entre ERp57 – LUM.

A.

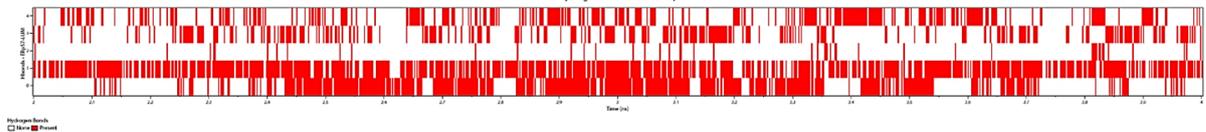


B.



C.

Mapa de existência de ligações de hidrogênio



A) LUM (lilás), ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas em verde), contribuições hidrofóbicas (linhas curvas em vermelho). B) Ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas), contribuições hidrofóbicas (linhas verdes). C) Taxas de ocupação (vermelho).

A interação entre ERp57 – LUM (frame 3.30 ns) apresentou contribuições hidrofóbicas tanto com resíduos polares (Ser¹²⁶, His¹²⁷, Lys¹³⁰, Asp¹⁴³, Glu¹⁴⁴, Lys¹⁴⁷, Asp¹⁵¹, Arg¹⁸³) quanto com resíduos não polares (Phe¹⁴⁸) (Figura 20 A e B; Tabela 4).

As ligações de hidrogênio previstas no frame estudado para ERp57 - LUM envolveram os resíduos de aminoácidos polares Arg¹⁸³ (positivo), Asp¹⁵¹ (negativo) e Lys¹⁴⁷ (positivo) (Figura 20 A; Tabela 4) com taxas de ocupação previstas de 48,1%, 18,3% e 15,3%, respectivamente (Tabela 5).

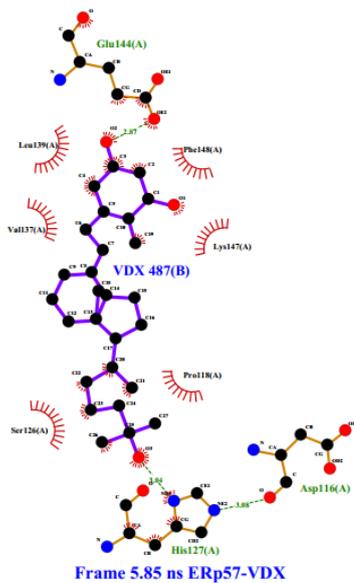
TABELA 5 – Taxas de ocupação de ligações de hidrogênio previstas na DM entre ERp57 - LUM.

ID	doador-aceptor	Número do átomo	Ocupação (%)
0	147LYS(HZ1) - 487LUM(O1)	1751 - 7190	15.3
1	183ARG(HE) - 487LUM(O2)	2310 - 7192	48.1
2	183ARG(H21) - 487LUM(O2)	2316 - 7192	11.5
3	487LUM(H38) - 151ASP(OD1)	7193 - 1814	17.6
4	487LUM(H38) - 151ASP(OD2)	7193 - 1815	18.3

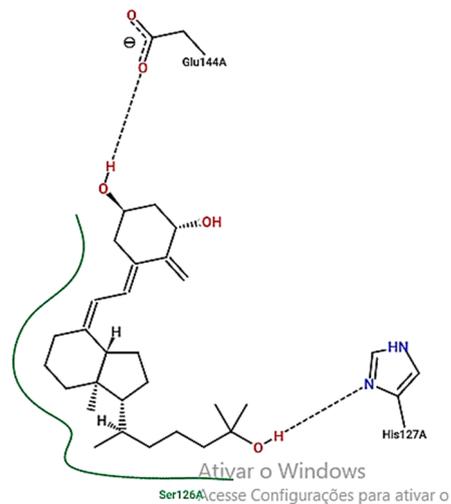
A maior taxa de ocupação prevista mostrou uma ligação de hidrogênio entre o resíduo de aminoácido polar Arg¹⁸³ (doador; átomo de hidrogênio denominado HE) pertencente à proteína ERp57 e o ligante LUM (aceptor; átomo de oxigênio O2) (Tabela 5 e Figura 20 A). Enquanto que, o ligante VDX interagiu com resíduos de Ser¹²⁶ (contribuições hidrofóbicas) e interagiu através de ligações de hidrogênio com os resíduos His¹²⁷ e Glu¹⁴⁴ (Figura 21 A e B).

FIGURA 21 – Ligações de hidrogênio e contribuições hidrofóbicas previstas pelas ferramentas A) LigPlot⁺ e B) PoseView e C) Mapa de existência de ligações de hidrogênio previstas na DM entre ERp57 – VDX.

A.

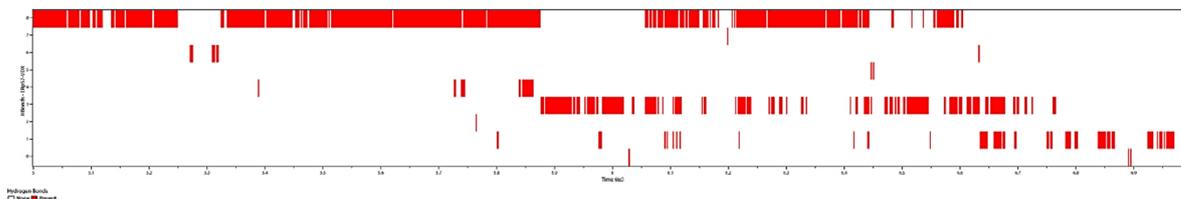


B.



C.

Mapa de existência de ligações de hidrogênio



A) VDX (lilás), ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas em verde), contribuições hidrofóbicas (linhas curvas em vermelho). B) Ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas), contribuições hidrofóbicas (linhas verdes). C) Taxas de ocupação (vermelho).

Além disso, a interação entre ERp57 - VDX (frame 5.85 ns) apresentou contribuições hidrofóbicas com resíduos não polares (Pro¹¹⁸, Val¹³⁷, Leu¹³⁹, Phe¹⁴⁸) e com resíduos polares (Ser¹²⁶, His¹²⁷, Glu¹⁴⁴, Lys¹⁴⁷) (Figura 21 A e B; Tabela 4).

Duas ligações de hidrogênio foram previstas entre VDX (doador; átomo de oxigênio denominado HO2) e o resíduo polar Glu¹⁴⁴ da proteína ERp57 (aceptor; átomos de oxigênio OE1 ou OE2) (Fig. 21 A e B). As taxas de ocupação para estas interações foram de 10,5% e 15,5%, respectivamente (Tabela 6).

TABELA 6 – Taxas de ocupação de ligações de hidrogênio previstas na DM entre ERp57 – VDX.

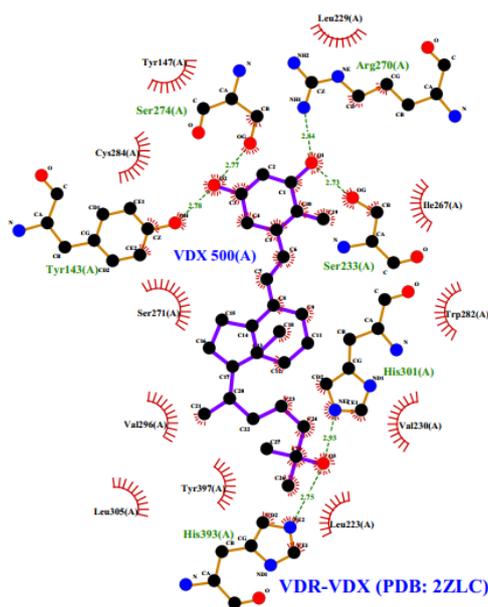
ID	doador-aceptor	Número do átomo	Ocupação (%)
0	487VDX(HO1) - 144GLU(O)	7208 - 1691	1.9
1	487VDX(HO1) - 147LYS(O)	7208 - 1755	2.4
2	487VDX(HO2) - 138PRO(O)	7210 - 1592	0.1
3	487VDX(HO2) - 144GLU(OE1)	7210 - 1688	10.5
4	487VDX(HO2) - 144GLU(OE2)	7210 - 1689	15.5
5	487VDX(HO3) - 126SER(OG)	7236 - 1410	0.0
6	487VDX(HO3) - 126SER(O)	7236 - 1413	0.4
7	487VDX(HO3) - 127HIS(N)	7236 - 1414	0.0
8	487VDX(HO3) - 127HIS(ND1)	7236 - 1422	14.0

Além disso, as taxas de ocupação das ligações de hidrogênio previstas para LUM foram coerentes com a afinidade esperada para este ligante ao interagir com o receptor de membrana ERp57, e desta forma, ocorrer a internalização celular da 1,25-D₃ (6-*s-cis*).

É importante ressaltar que as taxas de ocupação previstas para o ligante LUM foram aproximadamente quatro vezes maiores do que aquelas previstas para VDX. Esta evidência

apoia a teoria de que a interação entre LUM e ERp57 poderia ser favorecida (GAUCCI et al., 2016). Além disso, contribuições provenientes de outras ligações de hidrogênio preditas entre ERp57 - LUM ou ERp57 - VDX estão representadas nas Tabelas 4, 5 e 6. É importante destacar que quando se considera a interação do VDX com o receptor original (VDR) ele interage com mais resíduos de a.a. (Tyr¹⁴³, His³⁰¹, His³⁹³) numa região que compreende do resíduo 223 ao 233 e do resíduo 267 ao 274 quando comparado a interação VDX - ERp57 (His¹²⁷ e Glu¹⁴⁴). Desta forma é possível sugerir que o ligante VDX teria maior afinidade de ligação pelo próprio receptor VDR (Fig. 22).

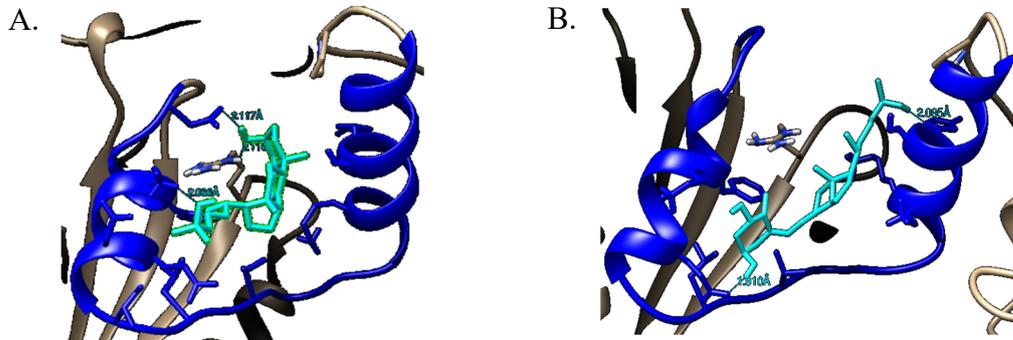
FIGURA 22 – Estrutura 2D representando as interações entre VDR-VDX (entrada PDB: 2ZLC).



VDX (lilás), ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas em verde), contribuições hidrofóbicas (linhas curvas em vermelho).

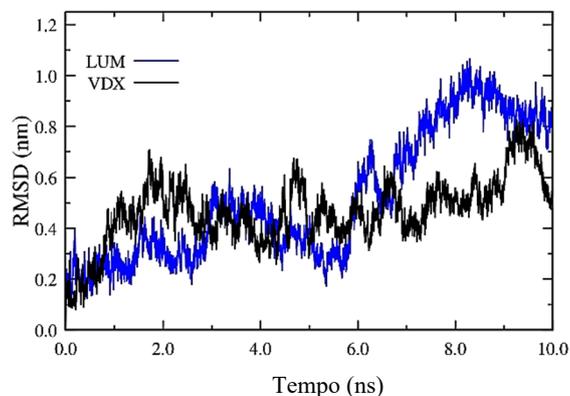
A visualização estrutural da área ao redor da interação entre ERp57 - LUM e entre ERp57 - VDX mostrou um arranjo composto por duas hélices (hélice 1, Ala¹²¹ – Ala¹³²; hélice 2, Glu¹⁴² – Ile¹⁴⁹) conectadas por um loop (Gly¹³³ – Thr¹⁴¹) (Fig. 7 A e 7 B), embora ambos os ligantes estivessem interagindo através de ligações de hidrogênio com diferentes resíduos de aminoácidos polares e apolares, provavelmente devido às suas características físico-químicas distintas (Tabela 2).

Figura 7. Mapeamento da região predita pelo software USFC Chimera para os complexos A) ERp57 - LUM (frame 3,30 ns) e B) ERp57 – VDX (frame 5,85 ns).



A existência de ligações de hidrogênio durante a maior parte da DM foi investigada nos frames ERp57 - LUM (3,30 ns) e ERp57 - VDX (5,85 ns) e contribuiu significativamente para a pequena variação dos valores RMSD preditos para cada ligante (Fig. 23), de acordo com o mapa de existência de H-bonds (Fig. 20 C e 21 C).

FIGURA 23 – Variação de RMSD predito entre ERp57 e os ligantes LUM e VDX.



A pequena variação de RMSD do ligante LUM em torno do frame 6,0 ns, pode ser atribuída aos resíduos de aminoácidos em diferentes distribuições espaciais (Lys¹⁴⁷, Asp¹⁵¹, Arg¹⁸³) onde este ligante interagiu através de ligações de hidrogênio. De fato, embora a literatura mencione somente os resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações entre ERp57 e VDX (GAUCCI et al., 2016), as simulações sugerem que o ligante LUM interage com um maior número de resíduos de aminoácidos e apresenta maior taxa de ocupação quando comparado ao ligante VDX (Tabela 7; Figura 21 C). É interessante destacar que, embora o tempo de meia vida do LUM seja muito mais curto, os resultados preditos *in silico* sugerem que

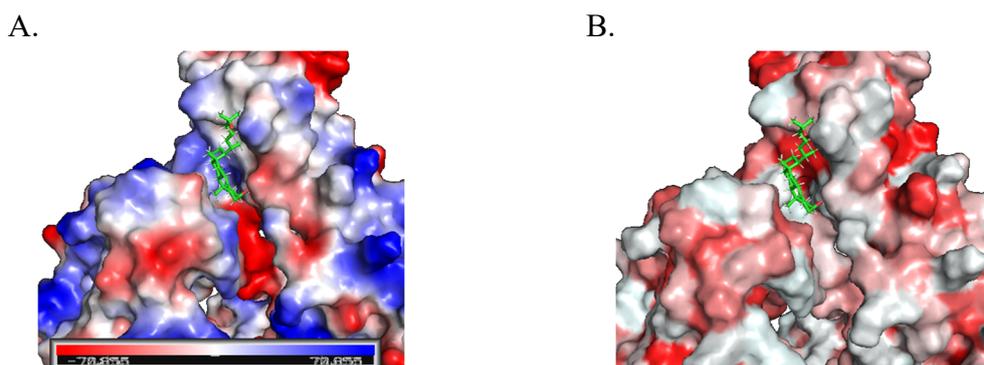
ele pode estar interagindo *in vitro* com ERp57 e contribuindo desta forma para a sinalização de proteínas intracelulares, conforme estudos realizados pelo grupo do pesquisador Norman (NORMAN, 2012).

Além disso, LUM interage através de ligação de hidrogênio em um sítio alostérico da ERp57, próximo ao local de fosforilação em resíduo de Ser¹⁵⁰. No entanto, é importante destacar que ERp57 é fosforilada em resíduo de Ser¹⁵⁰ sob condições metabólicas específicas (KITA et al., 2006) e portanto, a interação predita provavelmente não afetaria a atividade desta proteína. Além disso, as posições preditas para LUM e VDX nos frames selecionados encontravam-se em uma região oposta ao domínio de ligação ao DNA de homologia Rel (RHD) (NEMERE et al., 2004). Desta forma, ambos os ligantes provavelmente não comprometeriam a atividade transcripcional da ERp57 (SULLIVAN et al., 2007). Adicionalmente, os tipos de resíduos de aminoácidos no sítio de interação entre ERp57 – VDX foram similares (leucina, prolina, fenilalanina, lisina, valina, serina) aos preditos por Gaucci et al., 2016 e considerados como prováveis sítios de interação no *docking* entre ERp57 – VDX (GAUCCI et al., 2016). É importante destacar que, conforme visualizado no presente estudo, os locais de interação entre ERp57 - VDX (Fig. 22 A e B) não afetariam o papel oxidorreductase da proteína, conforme relatado na literatura (GAUCCI et al., 2016). Além disso, o caráter lipofílico dos ligantes (LUM e VDX) favorece a sua interação com proteínas localizadas na membrana na sua interface extracelular (ERp57) e na sua interface intracelular (PKC). Outras investigações complementares com células e animais poderão elucidar sobre alguns mecanismos moleculares desses processos biológicos. Embora o receptor ERp57 seja considerado específico para a forma 6-*s-cis* (LUM), ele também pode interagir com a forma 6-*s-trans* (VDX), conforme predito pelos ensaios das simulações computacionais.

A estrutura secundária do ERp57 inclui cavidades e fendas onde os ligantes podem ser inseridos. De fato as cavidades têm sido estudadas a fim de esclarecer o mecanismo molecular viável de ação de algumas drogas (ROSELL; FERNÁNDEZ-RECIO, 2020). A interação predita para ERp57 - LUM (frame 3.30 ns) envolveu resíduos de aminoácidos que não foram considerados uma cavidade pelo algoritmo ProteinsPlus. Então, alternativamente, as cavidades desta estrutura foram analisadas com o software CavityPlus (XU et al., 2018) que, predisse para o ligante LUM (frame 3,30 ns) sua inserção parcial em uma cavidade composta por número igual de resíduos de aminoácidos polares e apolares, com cargas predominantemente neutras.

Esta cavidade incluiu resíduos de aminoácidos que interagiram através de ligações de hidrogênio (Lis¹⁴⁷, Asp¹⁵¹, Arg¹⁸³) com as mais altas taxas de ocupação preditos nas simulações de DM.

FIGURA 24 – A) Superfícies eletrostática e B) hidrofóbicas preditas por APBS/PDB2QR, para o complexo ERp57 - LUM (frame 3.30 ns).



A) Regiões com carga positiva (azul) e regiões com carga negativa (vermelho). B) Regiões hidrofóbicas (vermelho).

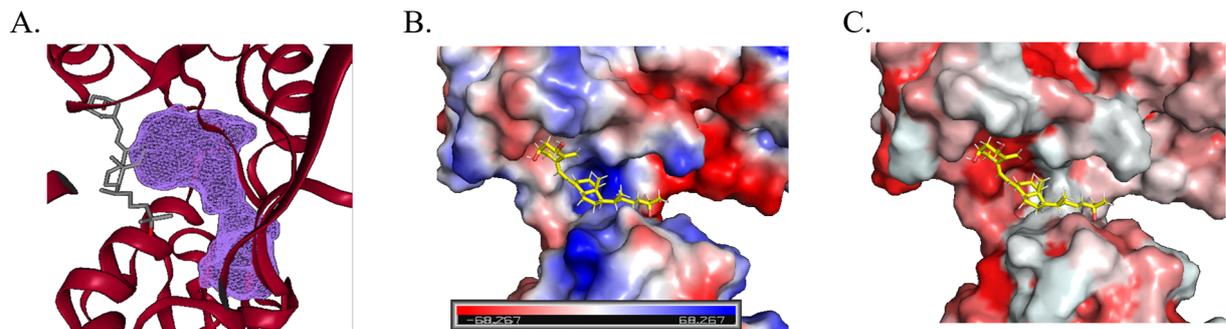
TABELA 7 – Cavidades preditas pela *ProteinsPlus* e *CavityPlus* para as interações proteína-ligante.

Interações (frame, ns)	Pocket (Drug Score)	Dimensões			Descritores de grupos funcionais			Composição de aminoácidos			
		Volume (Å ³)	Superfície (Å ²)	Profundidade (Å)	Ligações de hidrogênio		Contribuições hidrofóbicas	Apolar	Polar	Positivo	Negativo
Doadores	Aceptores										
ERp57 – LUM (3.30)*	P_1 (0.46)	287.36	590.67	10.76	15	20	25	0.38	0.31	0.25	0.06
ERp57 – VDX (5.85)	P_1 (0.74)	503.04	706.00	15.37	15	26	35	0.48	0.20	0.24	0.08

A interação predita na DM para ERp57 - VDX (frame 5.85 ns) mostrou que o ligante ficou posicionado em uma cavidade hidrofóbica formada por resíduos de aminoácidos predominantemente apolares (Pro¹¹⁸, Gly¹²³, Ser¹²⁶, His¹²⁷, Gly¹³³, Pro¹³⁴, Ala¹³⁵, Ser¹³⁶, Val¹³⁷, Pro¹³⁸, Leu¹³⁹, Glu¹⁴⁴, Phe¹⁴⁵, Lys¹⁴⁷, Phe¹⁴⁸, Ala¹⁵⁴, Phe¹⁸⁴, Ala¹⁸⁵) com carga neutra (Fig. 25 A e B). Confirmando o que foi calculado pela ferramenta DoGSiteScorer que mostrou o ligante (VDX) parcialmente inserido em uma cavidade 1 (P_1) com volume de 503.04 Å³, superfície de 706.00 Å² e profundidade de 15.37Å (Tabela 7). Esta ferramenta também mostrou

predominância de resíduos de aminoácidos apolares (score 0.48) com carga positiva (score 0.24) nesta cavidade (P_1).

FIGURA 25 – A) Cavidades previstas pela *ProteinsPlus* e B) Superfícies eletrostática e C) hidrofóbicas previstas por APBS/PDB2QR, para o complexo ERp57 - VDX (frame 5,85 ns).



A) VDX (cinza), cavidade (lilás). B) Regiões com carga positiva (azul) e regiões com carga negativa (vermelho). C) Regiões hidrofóbicas (vermelho).

Todos estes dados de interação estrutural, quando considerados em conjunto, determinaram condições que contribuíram para energias de interação mais favoráveis e para a estabilidade do complexo. Deve-se destacar que o ligante VDX apresentou um valor de Energia de Ligação Mecânica Molecular inferior ($-84.338 \pm 18,503$ kJ/mol) quando comparado com LUM ($-72,976 \pm 16,453$ kJ/mol) (Tabela 11). Isso reforça que ambos os ligantes têm afinidade pela proteína ERp57 (GAUCCI et al., 2016).

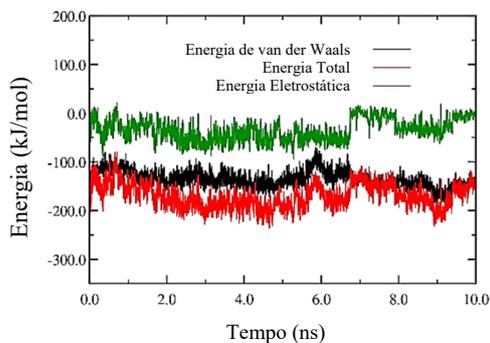
TABELA 8 – Energias calculadas pelo GROMACS (ΔG SASA) e pelo método MMPBSA para os complexos ERp57 – LUM e ERp57 – VDX.

Complexo proteína-ligante	Energia	Média \pm erro padrão (kJ/mol)							
		LUM				VDX			
GROMACS	Energia livre de solvatação SASA (ΔG_{solv})	-91.768 \pm 6.799				-95.448 \pm 5.882			
Energia Molecular Mecânica da Área de Superfície de Poisson-Boltzmann - MMPBSA	van der Waals	-135.588 \pm 16.920				-146.251 \pm 15.135			
	Eletrostática	-34.858 \pm 21.996				-28.124 \pm 15.480			
	Solvatação polar	114.580 \pm 27.853				107.778 \pm 25.992			
	Solvatação apolar SASA	-17.110 \pm 1.477				-17.740 \pm 1.346			
	Energia de ligação molecular mecânica	-72.976 \pm 16.453				-84.338 \pm 18.503			
Moléculas (Átomos)									
Ligações de hidrogênio preditas	Doador	ARG¹⁸³ (HE)	LUM (H38)	LUM (H38)	LYS¹⁴⁷ (HZ1)	VDX (HO2)	VDX (HO3)	VDX (HO2)	VDX (O3)
	Aceptor	LUM (O2)	ASP¹⁵¹ (OD2)	ASP¹⁵¹ (OD1)	LUM (O1)	GLU¹⁴⁴ (OE2)	HIS¹²⁷ (ND1)	GLU¹⁴⁴ (OE1)	LYS¹³⁰ (HZ1)
	Taxa de ocupação (%)	48.1	18.3	17.6	15.3	15.5	14.0	10.5	4.3

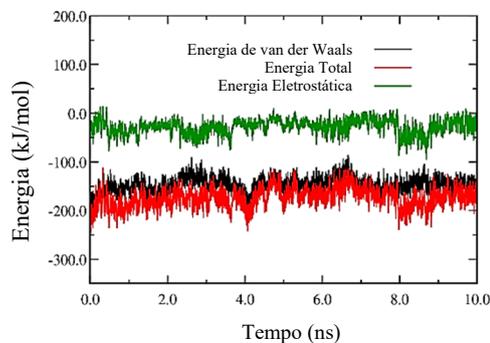
De fato, uma pequena diferença na variação da energia livre de solvatação SASA (ΔG_{solv}) entre VDX (- 95,448 \pm 5,882 kJ/mol) e LUM (- 91,768 \pm 6,799 kJ/mol) foi observada (Tabela 8; Fig. 26 C). Neste caso, ambos os ligantes apresentaram semelhanças nas energias envolvidas para manter o complexo ligado durante a maior parte do tempo de simulação (Tabela 8; Fig. 26 A e B).

FIGURA 26 – Energias relacionadas à manutenção dos complexos ERp57 - ligantes preditas pelas simulações de dinâmica molecular.

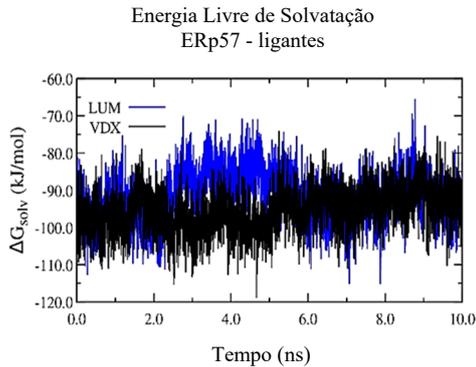
A.



B.



C.

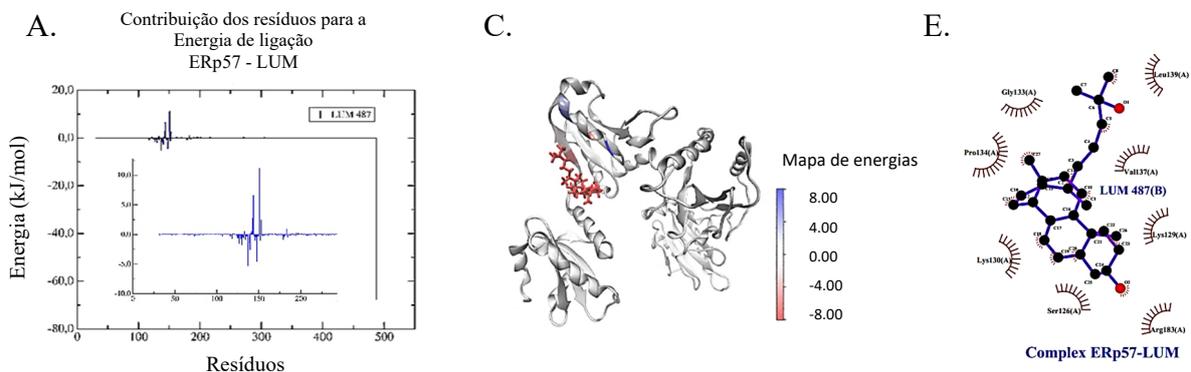


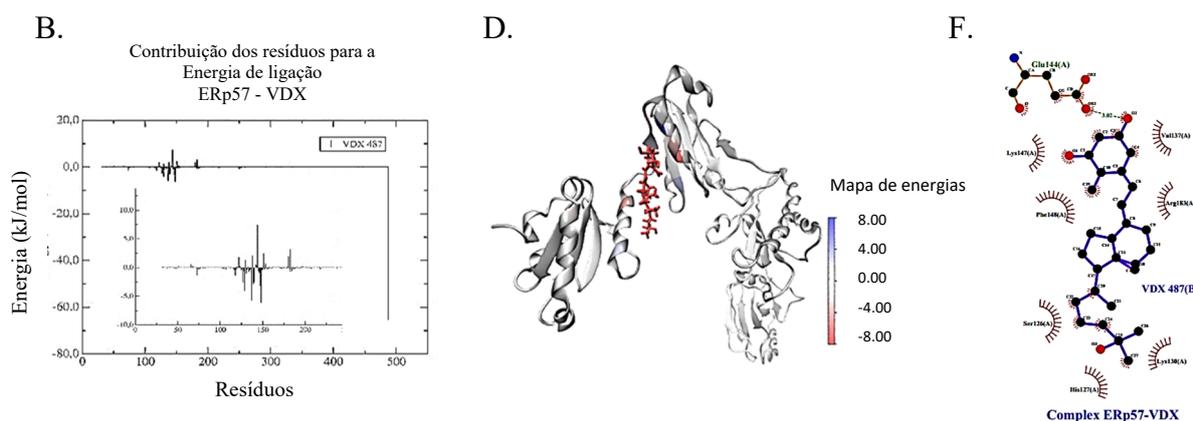
A) e B) Energia de van der Waals (preto), energia total (vermelho) e energia eletrostática (verde). C) Energia livre de solvatação SASA de LUM (azul) e VDX (preto).

Curiosamente, o menor valor de contribuição de energia previsto para LUM (-67.6193 ± 0.1286 kJ/mol vs -65.3583 ± 0.1135 kJ/mol, VDX) corrobora que esse ligante teve uma contribuição decisiva para a montagem do complexo em termos de variação de energia.

A Figura 28 A e B representa as energias de contribuição de cada resíduo para os complexos ERp57 - LUM e ERp57 - VDX no frame final, onde na imagem da dinâmica molecular visual (Fig. 27 C e D) os ligantes apresentaram o menor valor de energia de contribuição ($-67,619$ kJ/mol e $-65,3583$ kJ/mol, respectivamente), representados em vermelho.

FIGURA 27 – Contribuição dos resíduos para a energia de ligação entre A) ERp57 - LUM e B) ERp57 - VDX. Dinâmica molecular visual entre C) ERp57 - LUM e D) ERp57 - VDX. Complexos E) ERp57 - LUM e F) ERp57 - VDX preditos na DM.



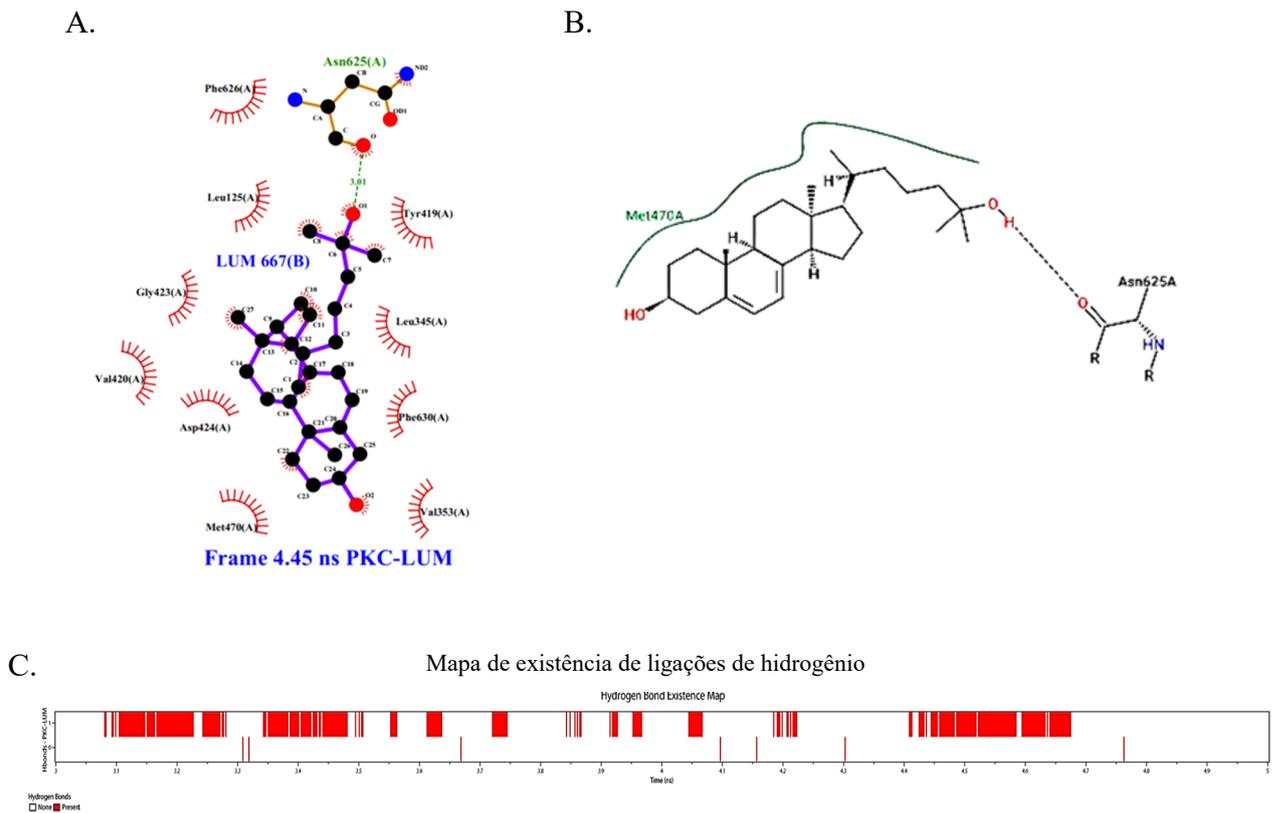


A DM entre o complexo ERp57 - LUM predisse resíduos de aminoácidos não polares Val¹³⁷ e Phe¹⁴⁸. Ambos os resíduos contribuíram para uma energia de ligação com os valores mais baixos (- 5,312 kJ/mol and - 4,532 kJ/mol, respectivamente). Como esperado, nenhuma ligação de hidrogênio foi predita para LUM e os resíduos Val¹³⁷ e Phe¹⁴⁸ ao longo do tempo de simulação (Tabela 4). É importante notar que, além dos resíduos não polares Val¹³⁷ e Phe¹⁴⁸ (- 5.720 kJ/mol e - 6.122 kJ/mol, respectivamente), o resíduo de aminoácido Lys¹²⁹ (- 4.0358 kJ/mol) também contribuiu para a energia de ligação com os menores valores no complexo ERp57 - VDX, ambos representados em vermelho (Fig. 27 C e D). Além disso, o resíduo de aminoácido Phe¹⁴⁸ já havia sido predito e relacionado às contribuições hidrofóbicas nos frames analisados para ERp57 - LUM (3.30 ns, Fig. 20 A) e ERp57 - VDX (5.85 ns, Fig. 21 A). Embora contribuições hidrofóbicas do resíduo Val¹³⁷ somente apareceram no frame analisado para ERp57 - VDX (5.85 ns, Fig. 21 A; Tabela 4).

5.3.4.2 PKC

Foram selecionados frames das interações PKC - LUM (4,55 ns) e PKC - VDX (1,20 ns) contendo resíduos de aminoácidos com as maiores taxas de ocupação. Estes frames estão representados no mapa de existência de H-bonds (Fig. 28 C). A ligação de hidrogênio predita manteve o ligante LUM interagindo com a PKC através do resíduo de aminoácido polar Asn⁶²⁵ (carga neutra), com taxa de ocupação de 9,0% (Tabelas 4 e 9). Esta ligação de hidrogênio foi predita entre os grupos hidroxila da proteína e ligante envolvendo o átomo de oxigênio (O1) do ligante LUM como doador de prótons (H17) e o átomo de oxigênio (O) do resíduo de aminoácido polar Asn⁶²⁵ como acceptor (Fig. 28 A e B; Tabela 9).

FIGURA 28 – Ligações de hidrogênio e contribuições hidrofóbicas previstas pelas ferramentas A) LigPlot⁺ e B) PoseView entre PKC e LUM. C) Mapa de existência de ligações de hidrogênio previstas na DM entre PKC – LUM.



A) LUM (lilás), ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas em verde), contribuições hidrofóbicas (linhas curvas em vermelho). B) Ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas), contribuições hidrofóbicas (linhas verdes). C) Taxas de ocupação (vermelho).

TABELA 9 – Taxas de ocupação de ligações de hidrogênio previstas na DM entre PKC - LUM.

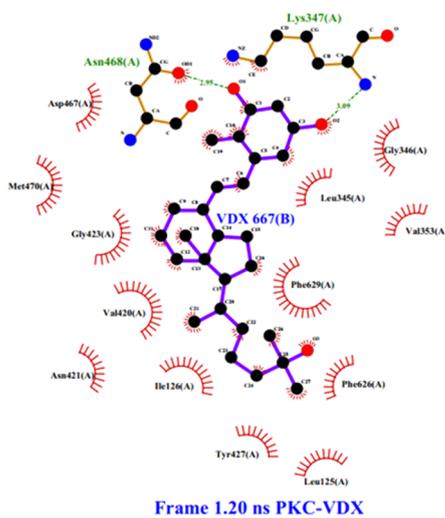
ID	doador-aceptor	Número do átomo	Ocupação (%)
0	628LYS(HZ1) - 667LUM(O1)	8463 - 9089	0.5
1	667LUM(HI7) - 625ASN(O)	9090 - 8413	9.0

Enquanto que o ligante VDX apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácido Asn⁴⁶⁸ (carga neutra) e Lys³⁴⁷ (carga positiva) com taxa de ocupação prevista de 19,0% e 13,3%, respectivamente (Fig. 29 A, B e C; Tabela 10). Nesta ligação, o átomo de

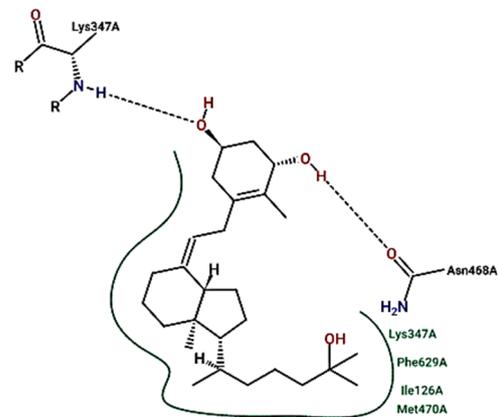
oxigênio (O1) do ligante VDX (doador) apresentou ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio (OD1) do resíduo de aminoácido Asn⁴⁶⁸. Enquanto que, as ligações de hidrogênio preditas entre VDX (aceptor) e PKC em Lys³⁴⁷ (doador) envolveram átomos de oxigênio do VDX (O1 ou O2) e um átomo de nitrogênio (N) do resíduo de aminoácido Lys³⁴⁷ (Fig. 29 A e B).

FIGURA 29 – Ligações de hidrogênio e contribuições hidrofóbicas preditas pelas ferramentas A) LigPlot⁺ e B) PoseView entre PKC e VDX. C) Mapa de existência de ligações de hidrogênio preditas na DM entre PKC – VDX.

A.

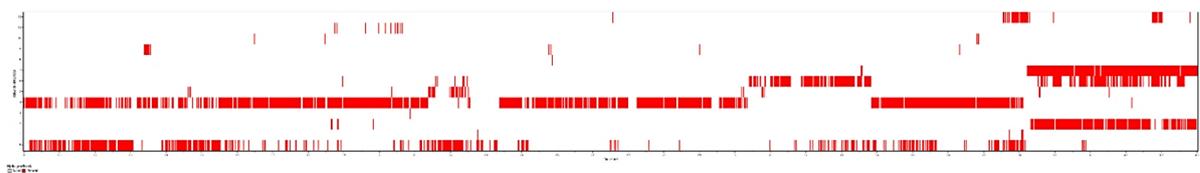


B.



C.

Mapa de existência de ligações de hidrogênio



A) VDX (lilás), ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas em verde), contribuições hidrofóbicas (linhas curvas em vermelho). B) Ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas), contribuições hidrofóbicas (linhas verdes). C) Taxas de ocupação (vermelho).

TABELA 10 – Taxas de ocupação de ligações de hidrogênio previstas na DM entre PKC - VDX.

ID	doador-aceptor	Número do átomo	Ocupação (%)
0	347LYS(H) - 667VDX(O2)	3950 - 9108	13.3
1	347LYS(HZ1) - 667VDX(O1)	3966 - 9106	0.8
2	348GLY(H) - 667VDX(O2)	3972 - 9108	0.2
3	481ASP(H) - 667VDX(O1)	6141 - 9106	0.0
4	667VDX(HO1) - 468ASN(OD1)	9107 - 5950	19.0
5	667VDX(HO1) - 481ASP(OD1)	9107 - 6148	0.9
6	667VDX(HO1) - 481ASP(OD2)	9107 - 6149	6.2
7	667VDX(HO2) - 345LEU(O)	9109 - 3941	13.9
8	667VDX(HO2) - 481ASP(OD1)	9109 - 6148	0.0
9	667VDX(HO2) - 481ASP(OD2)	9109 - 6149	0.3
10	667VDX(HO3) - 427TYR(OH)	9135 - 5258	0.1
11	667VDX(HO3) - 620GLY(O)	9135 - 8345	0.0
12	667VDX(HO3) - 625ASN(O)	9135 - 8413	5.1

Além disso, as simulações mostraram semelhanças nas interações hidrofóbicas entre os tipos de resíduos de aminoácido previstos para PKC-VDX (frame 1,20 ns) quando comparados a interação com VDR (receptor nuclear de vitamina D₃) - VDX (código PDB 2ZLC). Esses aminoácidos previstos caracterizaram-se por dois resíduos de leucina, dois resíduos de valina, um resíduo de isoleucina e um resíduo de tirosina (Fig. 29 A e Fig. 22).

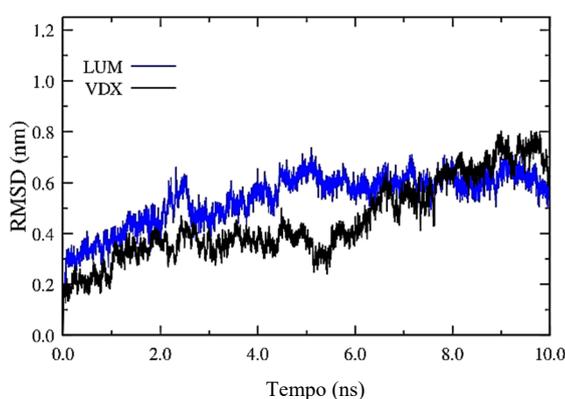
Adicionalmente, as contribuições hidrofóbicas previstas nas interações entre PKC-LUM (Fig. 28 A) e PKC-VDX (Fig. 29 A) envolveram os mesmos tipos de resíduos de aminoácidos (asparagina, aspartato, glicina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, tirosina e valina). As contribuições hidrofóbicas dos complexos finais envolveram a maioria dos resíduos de aminoácido também previstos nos frames estudados para PKC - LUM (4,45 ns) e PKC - VDX (1,20 ns) (Tabela 4; Fig. 31 E e F).

É importante ressaltar que na interação PKC - VDX a ligação de hidrogênio envolvendo o resíduo de aminoácido Leu³⁴⁵ (apolar) apresentou a segunda maior taxa de ocupação (13,9%) (Tabela 10). Embora a base de dados LigPlot⁺ tenha representado apenas sua contribuição hidrofóbica no frame 1,20 ns (Fig. 29 A e B). Leu³⁴⁵ e outros resíduos de aminoácido adicionais estabeleceram contribuições hidrofóbicas que devem ser consideradas para a manutenção do complexo (Tabela 4).

Surpreendentemente, as interações previstas entre PKC - LUM ou PKC - VDX foram quantitativamente diferentes. Como mencionado anteriormente, a presença de um grupamento

hidroxila adicional garantiu que o ligante VDX interagisse com um maior número de resíduos de aminoácido, quando comparado ao ligante LUM. No entanto, ambas as trajetórias resultaram em um pequeno deslocamento. De fato, os valores de RMSD foram muito próximos, comparativamente (Fig 30). Provavelmente, devido ao fato de que resíduos de aminoácidos semelhantes estavam envolvidos em ambas as interações (Leu¹²⁵, Leu³⁴⁵, Val⁴²⁰, Gly⁴²³, Met⁴⁷⁰ and Phe⁶²⁶).

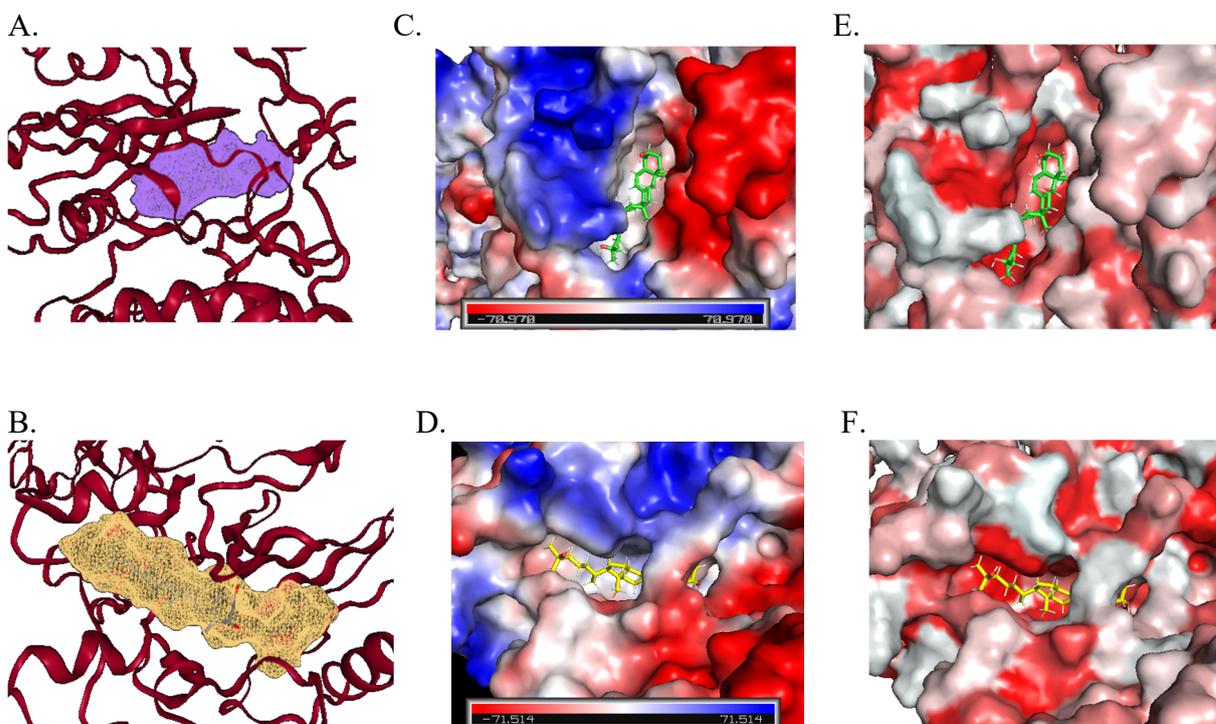
FIGURA 30 – Variação de RMSD predito entre PKC e os ligantes LUM e VDX.



Deve-se notar que nos frames estudados as posições dos ligantes (LUM ou VDX) não ocuparam os locais de fosforilação em resíduos de serina. Portanto, a interação de PKC com LUM ou VDX provavelmente não afetaria a atividade desta proteína fosfoquinase.

Cavidades são formadas após o dobramento da proteína PKC, nas quais os ligantes podem interagir de acordo com as propriedades dos resíduos de aminoácidos. As simulações de DM resultaram em pontuações de drugabilidade semelhantes para as interações PKC - LUM (frame 4,55 ns; score 0,84) e PKC - VDX (frame 1,20 ns; score 0,83) (Tabela 11). Além disso, ambas as interações mostraram os ligantes totalmente inseridos na cavidade de maior afinidade (P_1, PKC - LUM; P_0, PKC - VDX) (Fig. 31 A e B). Confirmando assim, que ambos os ligantes são moléculas bioativas. Embora houvesse semelhanças em termos de composição de aminoácidos nessas cavidades, foi observado um maior número de contribuições hidrofóbicas para o ligante VDX (67) conforme ilustrado na área de superfície hidrofóbica (Fig. 31 E e F; Tabela 11). Conforme predito na composição de aminoácidos, o ligante VDX interage em locais com menor número de resíduos negativos (0,11) quando comparado ao LUM (0,17). Isto pode ser devido à possibilidade de protonação dos três grupamentos hidroxila (Tabela 11).

FIGURA 31 – Cavidades previstas pela *ProteinsPlus* entre A) PKC - LUM e B) PKC - VDX. Superfícies eletrostáticas previstas para C) PKC - LUM e D) PKC - VDX e superfícies hidrofóbicas previstas para os complexos E) PKC - LUM (frame 4,45 ns) e PKC - VDX (frame 1,20 ns) por APBS/PDB2QR.



A) LUM (cinza), cavidade (lilás). B) VDX (cinza), cavidade (amarelo). C) e D) Regiões com carga positiva (azul) e regiões com carga negativa (vermelho). E) e F) Regiões hidrofóbicas (vermelho).

TABELA 11 – Cavidades previstas pela *ProteinsPlus* para as interações proteína-ligante.

Interações (frame, ns)	Pocket (Drug Score)	Dimensões			Descritores de grupos funcionais			Composição de aminoácidos			
		Volume (Å ³)	Superfície (Å ²)	Profundidade (Å)	Ligações de hidrogênio		Contribuições hidrofóbicas	Apolar	Polar	Positivo	Negativo
Doadores	Aceptores										
PKC-LUM (4.55)	P_1 (0.84)	679.02	803.54	21.02	15	21	54	0.52	0.24	0.07	0.17
PKC-VDX (1.20)	P_0 (0.83)	939.05	1049.02	27.93	15	41	67	0.53	0.31	0.06	0.11

Em função da conformação estrutural, o ligante VDX apresenta maior número de diedros rotacionáveis. Desta forma, este ligante pode interagir com maior número de resíduos de aminoácidos. Estes resíduos apresentaram características de energia de van der Waals e energia eletrostática que contribuíram para menor valor de energia molecular mecânica

calculada (-132.074 ± 16.512 kJ/mol) quando comparado ao ligante LUM (-119.007 ± 17.509 kJ/mol) (Tabela 12).

TABELA 12 – Energias calculadas pelo GROMACS (ΔG SASA) e pelo método MMPBSA para os complexos PKC – LUM e PKC – VDX.

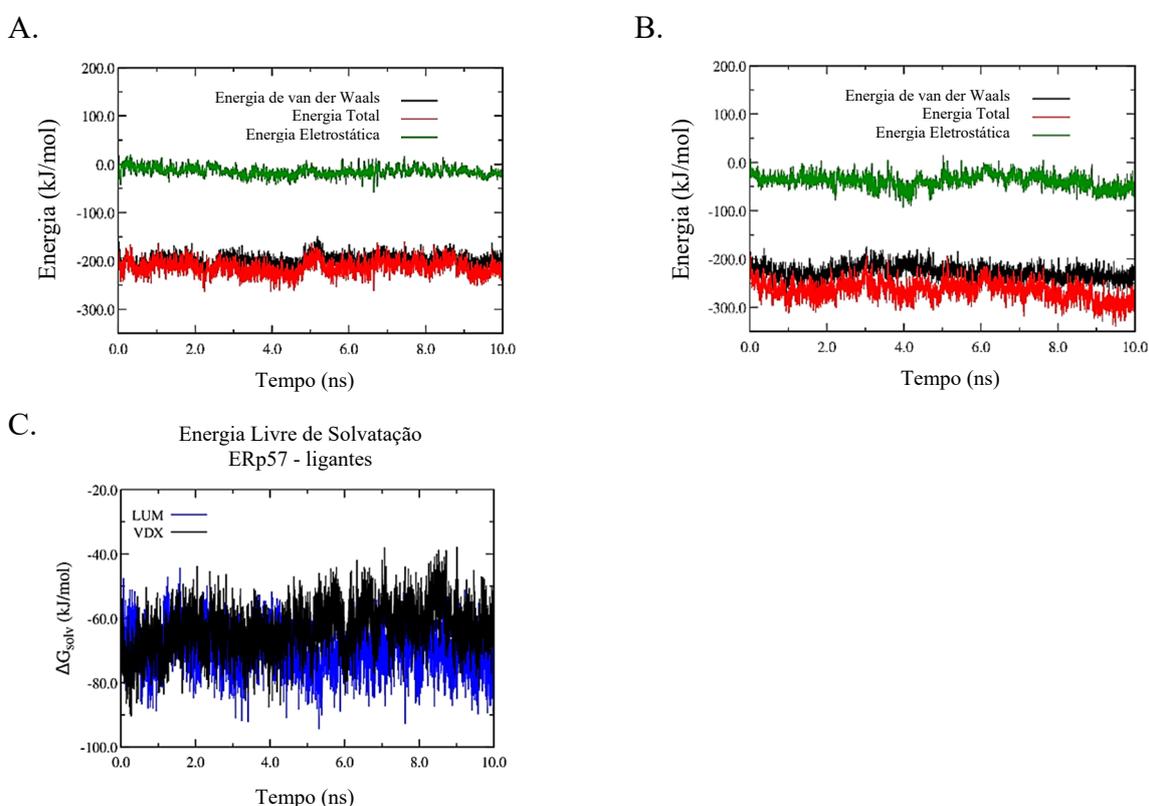
Complexo proteína-ligante	Energia	Média \pm erro padrão (kJ/mol)						
		LUM			VDX			
GROMACS	Energia livre de solvatação SASA (ΔG_{solv})	-69.851 ± 7.067			-63.464 ± 7.667			
Energia Molecular Mecânica da Área de Superfície de Poisson-Boltzmann - MMPBSA	van der Waals	-198.866 ± 12.267			-227.809 ± 14.359			
	Electrostática	-14.773 ± 9.263			-38.627 ± 14.630			
	Solvatação polar	116.678 ± 21.924			158.962 ± 18.777			
	Solvatação apolar SASA	-22.047 ± 1.077			-24.600 ± 0.961			
	Energia de ligação molecular mecânica	-119.007 ± 17.509			-132.074 ± 16.512			
Moleculas (Atoms)								
Ligações de hidrogênio preditas	Doador	LUM (H17)	LUM (H38)	LYS ⁶²⁸ (HZ1)	VDX (HO1)	ARG ⁶³² (H11)	VDX (HO3)	ASN ⁶²⁵ (D21)
	Aceptor	ASN ⁶²⁵ (O)	ASP ⁴⁸¹ (OD2)	LUM (O1)	ASN ⁴⁶⁸ (OD1)	VDX (O2)	LEU ¹²⁵ (O)	VDX (O3)
	Taxa de ocupação (%)	9.0	0.6	0.5	19.0	17.5	16.4	15.1

Ainda que a diferença para a energia molecular mecânica tenha sido pequena, nos dois casos a energia calculada sugere que ambos os ligantes podem realmente interagir com a proteína PKC durante todo o tempo da simulação (10 ns). Portanto, considerando a importância da PKC na ativação da via de sinalização Ras-Raf-MEK-MAPK-ERK1/2, e tendo em mente que os ensaios *in vitro* foram realizados com a 1,25-D₃ (6-*s-trans*), que pode ser convertida na forma 6-*s-cis* em questão de milissegundos (HAUSSLER et al., 2011), esta última (6-*s-cis*) poderia estar contribuindo para a resposta observada (Fig. 29 A e B; Fig. 30 A e B).

O frame escolhido para a análise das interações entre PKC - LUM ficou dentro do intervalo de 3 – 5 ns, pois a ligação de hidrogênio predita entre o ligante com o resíduo (Asn⁶²⁵) com a maior taxa de ocupação foi observada neste intervalo (Tabela 12; Fig. 29 C). Cabe destacar, que esta ligação também foi predita no intervalo compreendido entre 8.0 ns e em torno de 8.25 ns. No entanto, observou-se uma menor variação de RMSD do ligante LUM a partir do tempo ao redor de 5 ns em diante (Fig. 31). Além disso, o menor valor de variação de energia livre de solvatação SASA (ΔG_{solv}) de LUM ($-69,851 \pm 7,067$ kJ / mol) comparativamente ao VDX ($-63,464 \pm 7,667$ kJ / mol) (Fig. 33 C; Tabela 15) sugere que o caráter hidrofóbico estrutural de LUM (Tabela 2) favoreceu sua permanência em uma cavidade de superfície mais

hidrofóbica (Fig. 32 E) constituída predominantemente por resíduos apolares. Este fenômeno se dá principalmente em função do coeficiente de partição óleo/água do ligante LUM ($\text{Log}P$ 5.61) comparativamente ao ligante VDX ($\text{Log}P$ 5.03) (Tabela 2). Cabe destacar que a energia livre de solvatação SASA (Área de Superfície Acessível ao Solvente) pode ser entendida como a energia necessária para mover uma molécula de um ambiente polar (aquoso) para um ambiente não polar como no caso da região da cavidade hidrofóbica.

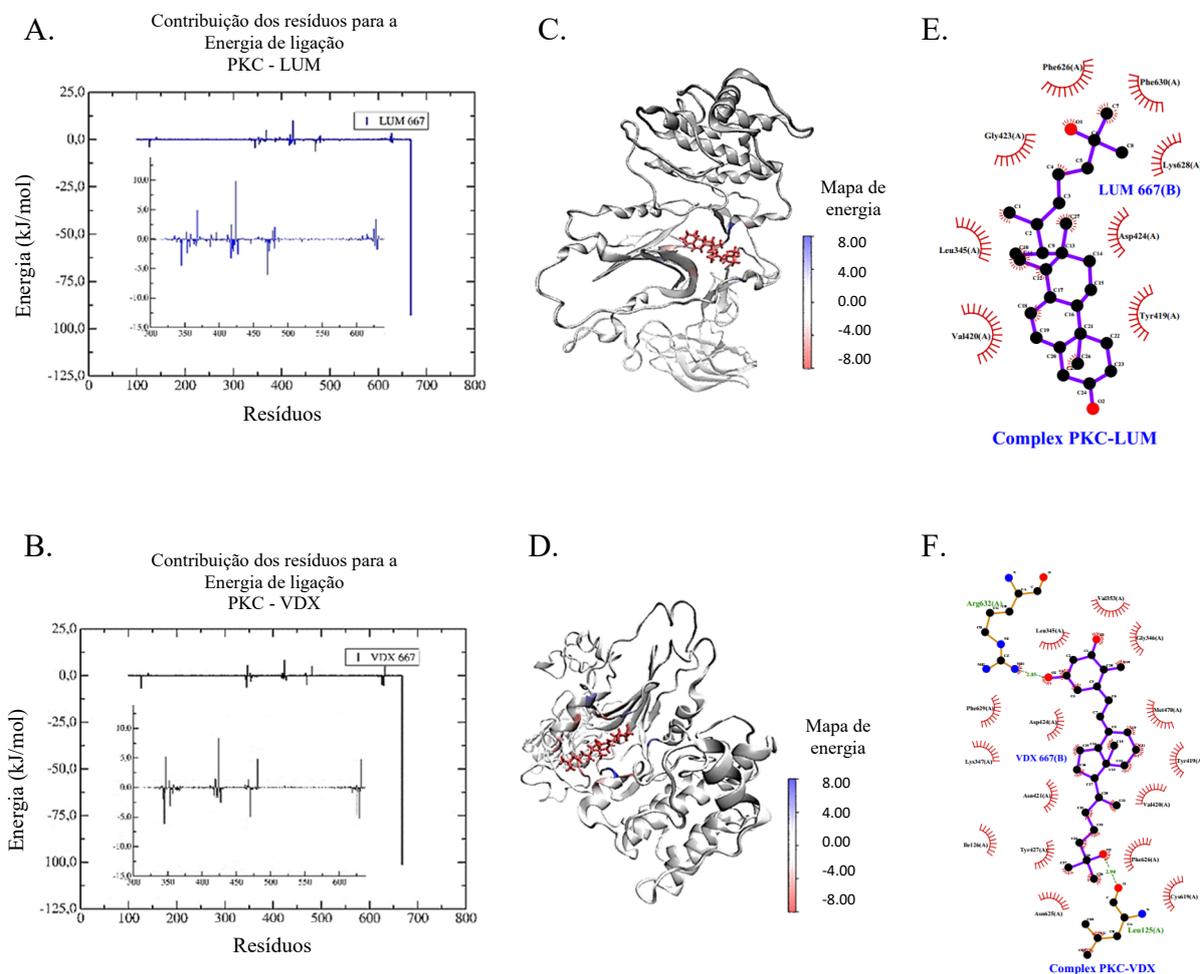
FIGURA 32 – Energias relacionadas à manutenção dos complexos PKC - ligantes previstas pelas simulações de dinâmica molecular.



A) e B) Energia de van der Waals (preto), energia total (vermelho) e energia eletrostática (verde). C) Energia livre de solvatação SASA de LUM (azul) e VDX (preto).

As energias de contribuição de cada resíduo do complexo PKC - LUM e PKC - VDX no frame final estão representadas na Figura 34.

FIGURA 33 – Contribuição dos resíduos para a energia de ligação entre A) PKC - LUM e B) PKC - VDX. Dinâmica molecular visual entre C) PKC - LUM e D) PKC - VDX. Complexos E) PKC - LUM e F) PKC - VDX preditos na DM.



LUM e VDX mostraram o menor valor de energia de contribuição (-92.7409 ± 0.0828 kJ/mol e -101.2827 ± 0.0988 kJ/mol, respectivamente), ambos representados em vermelho (Fig. 33 C e D). O complexo final PKC - LUM predisse os resíduos de aminoácidos não polares Met⁴⁷⁰ Leu³⁴⁵ e Ile¹²⁶. Esses resíduos contribuíram para a energia de ligação com os menores valores (- 6.135 kJ/mol, - 4.530 kJ/mol e - 4.011 kJ/mol, respectivamente). Como esperado, nenhuma ligação de hidrogênio foi predita entre LUM e os resíduos Met⁴⁷⁰, Leu³⁴⁵ e Ile¹²⁶ ao longo do tempo de simulação (Tabela 4; Fig. 28 A e B). Da mesma forma, os resíduos de aminoácidos não polares Ile¹²⁶ e Leu³⁴⁵, também contribuíram para a energia de ligação no complexo PKC - VDX com os menores valores (- 6.822 kJ/mol and - 6.156 kJ/mol, respectivamente), além do resíduo Phe⁶²⁹ (- 5.203 kJ/mol) todos representados em vermelho claro. Adicionalmente, o resíduo de aminoácido Leu³⁴⁵ já havia sido predito e relacionado às

contribuições hidrofóbicas nos frames analisados entre PKC - LUM (4.45 ns, Fig. 28 A) e PKC - VDX (1.20 ns, Fig. 29 A). Entretanto, as contribuições hidrofóbicas do resíduo Ile¹²⁶ apareceram somente no frame analisado entre PKC - VDX (1.20 ns, Fig. 29 A; Tabela 4).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a 1,25-D₃, mas não o colecalciferol, preveniu a resistência à insulina promovida pela dexametasona. Além disso, a 1,25-D₃ participou da manutenção gradual e durabilidade prolongada da diminuição da glicemia de ratos resistentes no teste de tolerância à insulina. Ao contrário disto, o colecalciferol não melhorou o KTTI (%) em ratos resistentes à insulina. Quando administrado por via intraperitoneal, o tratamento com 1,25-D₃ a curto prazo foi rapidamente absorvido, mostrando a especificidade deste metabólito em melhorar a glicemia e diminuir a resistência à insulina.

A resistência à insulina está associada a um processo inflamatório sistêmico do tecido adiposo, músculo e fígado e subsequente aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a apoptose e disfunção das células β pancreáticas (KHODABANDEHLOO et al., 2016). Nesse contexto, foi descrito que a vitamina D₃ suprime a secreção de citocinas pró-inflamatórias e promove a liberação de citocinas anti-inflamatórias, protegendo as células β pancreáticas contra a apoptose (PITTAS et al., 2007).

De acordo com estudos anteriores, o presente estudo mostrou que o tratamento com 1,25-D₃ diminuiu o conteúdo de aminotransferases hepáticas (ALT e AST) (LORVAND AMIRI et al., 2017; PAPAPOSTOLI; LAMMERT; STOKES, 2016), bem como, a atividade da LDH (ZENG et al., 2017).

Aqui foi observado que ratos resistentes à insulina tratados com 1,25-D₃ apresentaram diminuição nas concentrações plasmáticas de CT. Além disso, concentrações elevadas de vitamina D₃ foram associadas a um perfil lipídico favorável (JORDE; GRIMNES, 2011), fornecendo evidência para um potencial marcador de saúde cardiovascular (PONDA et al., 2012).

O tratamento a curto prazo com 1,25-D₃ manteve as concentrações basais de cálcio total, porém, houve aumento nas concentrações de cálcio sérico nos animais resistentes à insulina e a 1,25-D₃ foi insuficiente para regular esse efeito. Considera-se que os valores de cálcio sérico e a resistência periférica à insulina estão correlacionados e podem influenciar um ao outro através de mecanismos fisiopatológicos e metabólicos (SUN et al., 2005; WU et al., 2019). Além disso, alterações no cálcio intracelular podem interferir na secreção de insulina nas células β pancreáticas, que dependem do influxo de cálcio através dos VDCC (HENQUIN, 2000).

Foi observado que no modelo *in vitro*, a 1,25-D₃ (1 nM) estimulou a secreção de insulina estática, pelas ilhotas pancreáticas isoladas de ratos, com um aumento de 75%. De acordo com

esses dados, Kjalarsdottir et al. (KJALARSDOTTIR et al., 2019) revelaram, em um ensaio de secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS), que ilhotas de camundongos pré-tratadas com 1,25-D₃ (0,2 nM, 2 nM ou 20 nM) duplicaram a secreção de insulina (KJALARSDOTTIR et al., 2019). Além disso, outro estudo realizado em linhagem clonal de células β pancreáticas de ratos, mostrou que a 1,25-D₃ evocou oscilações no ($[Ca^{2+}]_i$), independentemente da concentração de glicose. A amplitude e a frequência das oscilações de cálcio e as oscilações de liberação de insulina pulsátil foram proporcionais à concentração de 1,25-D₃ (SERGEEV; RHOTEN, 1995).

A partir dos resultados obtidos no teste de tolerância à insulina, foi investigado o possível mecanismo de ação da 1,25-D₃ nas ilhotas pancreáticas, através dos canais de cálcio e potássio. Estudos anteriores relatam que as ações da 1,25-D₃ (associado ao VDR) envolvem efeitos genômicos e efeitos não genômicos, também chamados de respostas rápidas (MIZWICKI; NORMAN, 2009). Estes efeitos rápidos são descritos por regularem a função biológica celular, interagindo potencialmente com outras cascatas de proteínas cinases e/ou com o núcleo da célula, e controlando respostas genômicas associadas à diferenciação e proliferação celular (BERRY et al., 1996).

O influxo de cálcio através dos VDCC, desempenha um papel importante no processo de secreção de insulina induzida por glicose, a partir das células β pancreáticas. Alterações na concentração de cálcio livre em diferentes compartimentos (citossol, retículo endoplasmático, mitocôndrias, aparato de Golgi, núcleo, vesículas secretoras, endossomos, lisossomos) são cruciais para o controle de várias funções celulares. Além disso, as alterações de cálcio nos compartimentos subcelulares controlam uma ampla variedade de processos, como metabolismo celular, apoptose, expressão gênica, estresse de retículo endoplasmático (RE), e exocitose de microvesículas sinápticas ou vesículas densas contendo insulina (GILON et al., 2014). O tratamento *in vitro* com 1,25-D₃ aumentou o influxo de $^{45}Ca^{2+}$, exibindo uma resposta rápida da célula a este evento. De acordo com estudos anteriores, o tratamento de células duodenais isoladas de pintos (com suficiência de vitamina D₃), após 1 min de exposição a 1,25-D₃ (130 pM), aumentou rapidamente o transporte de $^{45}Ca^{2+}$ acima dos valores basais (DE BOLAND; NORMAN, 1990).

Aqui foi demonstrado a participação dos canais de K⁺-ATP no mecanismo de ação da 1,25-D₃. Esses dados corroboram estudos anteriores, realizados em ilhotas pancreáticas de

ratos, em que a $1,25(\text{OH})_2\text{vitamin D}_3$ (um análogo da $1,25\text{-D}_3$) não foi suficiente para aumentar a secreção de insulina na presença de diazoxide, mesmo com estímulo de altas concentrações de glicose (KAJIKAWA et al., 1999). O controle da secreção de insulina pela glicose é sustentado pela evidência do fechamento farmacológico dos canais de K^+ -ATP pelas sulfonilureias hipoglicêmicas (tolbutamida, gliclazida, glibenclamida) que estimulam a secreção de insulina, mesmo na ausência de uma concentração estimulatória de glicose, enquanto que a abertura desses canais (pelo diazoxide) impede a glicose de estimular a secreção de insulina pelas células β pancreáticas (GILON et al., 2014).

No presente estudo, a colchicina, um agente despolimerizante de microtúbulos, foi utilizada para verificar o papel da integridade do citoesqueleto na exocitose regulada de vesículas de insulina. As vesículas de insulina são capazes de interagir com os microtúbulos como um guia para fornecer controle direcional a esse movimento (EASOM, 2000). Vários estudos demonstraram que fármacos conhecidos por interferir na polimerização da tubulina (colchicina ou outros agentes despolimerizantes de microtúbulos) inibem a secreção de insulina de regiões de pâncreas de ratos, ilhotas isoladas ou pâncreas perfundido (LACY; WALKER; FINK, 1972; MALAISSE et al., 1971; VAN OBERGHEN et al., 1973). A inibição do efeito estimulatório da $1,25\text{-D}_3$ no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pela colchicina, evidencia que a integridade da rede do citoesqueleto celular é crucial para todo o processo de exocitose regulada de vesículas secretórias de insulina mediado pela $1,25\text{-D}_3$ (WANG; THURMOND, 2009). A *N*-etilmaleimida, um inibidor da fusão vesicular, foi utilizada para verificar a etapa final da exocitose regulada das vesículas secretórias de insulina. No entanto, embora as proteínas SNARE constituam a entidade catalítica necessária para a fusão de membrana, elas não são suficientes para explicar a exocitose rápida dependente de cálcio na maioria das células secretoras. Além do complexo SNARE central, várias proteínas acessórias também estão implicadas na regulação do processo de fusão das vesículas de insulina (HOU; MIN; PESSIN, 2009). Esses relatos poderiam explicar o efeito estimulatório da $1,25\text{-D}_3$ no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, sugerindo um papel desse composto na modulação da fusão de vesículas secretórias de insulina na exocitose regulada, mesmo com um aumento da concentração de cálcio citosólico nas ilhotas pancreáticas isoladas, uma vez que a montagem do complexo SNARE não depende apenas de cálcio para a fusão de vesículas (BRUNGER et al., 2018).

O referido estudo também mostrou a influência do cálcio extracelular no mecanismo de ação da $1,25\text{-D}_3$ como um gatilho para a secreção de insulina, com o uso do nifedipino, um bloqueador dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCC). De acordo com

esses dados, estudos anteriores descreveram sobre o envolvimento do cálcio extracelular, mediado pela ativação do L-VDCC, no mecanismo de ação dos triterpenos 3 β -hidroxihop-22(29)eno (CASTRO et al., 2015b), ácido betulínico (GOMES CASTRO et al., 2018) e fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol (DA LUZ et al., 2016), em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos. Os triterpenos tem um papel na regulação da homeostase sérica da glicose, aumentando a secreção de insulina (secretagogo), assim como 1,25-D₃, ou estimulando a captação de glicose nos tecidos-alvo da insulina (insulinomimético) (GOMES CASTRO et al., 2014).

A influência do cálcio dos estoques intracelulares no rápido influxo de cálcio também foi verificada após a incubação com 1,25-D₃. Embora o influxo de cálcio tenha aumentado quando o cálcio intracelular foi quelado pelo BAPTA-AM, ele não modificou o efeito estimulatório da 1,25-D₃ no influxo de cálcio. Em contraste, o efeito agudo do triterpenóide 3 β -hidroxihop-22(29)eno, que assim como a 1,25-D₃, também é derivado do esqualeno, induziu a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas, acionando o influxo de cálcio que foi regulado pela concentração de cálcio intracelular (CASTRO et al., 2015b). Entretanto, nossas descobertas estão alinhadas com o efeito de um derivado triterpenóide, fern-9(11)-eno-2 α ,3 β -diol, em que o efeito estimulatório na secreção de insulina foi mediado por influxo de cálcio não relacionado ao cálcio intracelular, onde a presença de BAPTA-AM não alterou a ação desse triterpeno no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos (DA LUZ et al., 2016).

O envolvimento do retículo sarcoplasmático (SERCA), um importante reservatório intracelular de cálcio, também foi observado no efeito estimulatório da 1,25-D₃. Quando o transporte de cálcio do citosol para o retículo foi bloqueado pela tapsigargina, o influxo de cálcio diminuiu significativamente. A tapsigargina é um mobilizador específico das reservas de cálcio do RE e causa um aumento rápido e transitório de cálcio intracelular. O tratamento de células de câncer de mama, MCF-7, com 1,25-D₃ ou o análogo quimioterapêutico (EB 1089), por 3-5 dias, promoveu aumento na liberação de reservas de cálcio do RE (MATHIASSEN et al., 2002). Um aumento nos estoques de cálcio do RE inibe uma corrente despolarizante operada por estes estoques (SOC), envolvendo a justaposição de canais STIM / Orai (seletivo para cálcio). As flutuações do SOC são possíveis durante as oscilações de cálcio citosólico e podem, assim, controlar o potencial de membrana e interferir na secreção de insulina pelas células β pancreáticas (GILON et al., 2014).

De acordo com os dados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que a 1,25-D₃ estimula o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos, através dos VDCC e canais de K⁺-ATP, presentes na membrana plasmática, bem como, a mobilização de cálcio dos estoques no RE, através dos receptores de rianodina (RYR) e através do receptor inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). De acordo com estes resultados, estudo anterior também mostrou a participação dos receptores IP₃ na regulação da secreção de insulina após suplementação com vitamina D₃ (JAYANARAYANAN et al., 2015).

Neste trabalho, também foi comprovado o envolvimento das vias de sinalização de PKCs convencionais dependentes de cálcio no mecanismo de ação da 1,25-D₃ no influxo de cálcio. Este pode ser um mecanismo de controle chave para esse processo, pois uma vez ativadas nas células β, as PKCs convencionais (por estimulação da glicose quando DAG é produzido pelo influxo de cálcio) são descritas por potencializar a secreção de insulina, aumentando a sensibilidade ao cálcio da maquinaria exocitótica. Esse processo ocorre principalmente através da reorganização da rede de actina cortical e, portanto, permite que mais grânulos de insulina se encaixem na membrana plasmática, potencializando a liberação sustentada de insulina; e através da fosforilação das proteínas exocitóticas munc18, SNAP25 e sinaptotagmina, que poderiam melhorar a adesão das vesículas, fornecendo mais locais de adesão ou aumentando a afinidade das vesículas com a membrana plasmática. Além disso, a interação entre os L-VDCC e os grânulos de insulina também pode ser modulada por PKC. A modulação desses canais poderia fornecer um mecanismo direto para aumentar a resposta do cálcio ao metabolismo da glicose e conseqüentemente aumentar a resposta exocitótica (TREXLER; TARASKA, 2017). A PKA também está envolvida no mecanismo de ação da 1,25-D₃ em células pancreáticas isoladas, o uso de um inibidor da proteína cinase dependente de AMP cíclico (AMPc), comprovou esta conclusão. Os resultados aqui apresentados corroboram com estudos anteriores, que indicaram que a 1,25-D₃, via fosforilação da PKA, estimula o influxo de cálcio, através dos canais de cálcio, em cardiomiócitos de camundongos (DELGADO et al., 2017b) e no córtex cerebral de ratos (ZANATTA et al., 2012). Em células β pancreáticas, a PKA facilita o acoplamento das vesículas de insulina e a ativação da exocitose, por fosforilação do complexo SNARE e de proteínas associadas a este evento (CHHEDA et al., 2001). Além disso, a PKA fosforila K⁺-ATP para reduzir a atividade dos canais de K⁺-ATP, e contribuir para a despolarização da membrana plasmática e abertura dos VDCC (TENGHOLM, 2012).

A via de sinalização ativada por mitógeno MAPK/ERK 1/2 possui importante papel no mecanismo de ação da 1,25-D₃. Neste contexto, a 1,25-D₃ é descrita por inibir a fosforilação e

consequentemente a via MAPK/ERK1/2, evitando assim, principalmente processos inflamatórios e apoptóticos em diferentes tecidos (CHOI et al., 2013; DING; WILDING; BING, 2013; EL-MANSI; AL-KAHTANI, 2019; HUANG et al., 2015). Quando MAPK é fosforilada, é direcionada ao ambiente nuclear e, por sua vez, fosforila fatores de transcrição, designados como efetores à jusante, resultando na regulação de genes específicos (SCHWARTZ et al., 2001). No presente estudo, o tratamento *in vitro* com 1,25-D₃ apresentou efeito estimulatório na fosforilação e ativação de proteínas pertencentes a via MAPK/ERK 1/2. Semelhante a estes dados, estudo anterior mostrou que o hormônio induziu uma rápida fosforilação e ativação da ERK 1/2 em células de Sertoli de ratos, apoiando o envolvimento desta proteína cinase no mecanismo de ação da 1,25-D₃. O efeito estimulatório da 1,25-D₃ na fosforilação da ERK 1/2 corrobora uma conexão intracelular entre o rápido influxo de cálcio à atividade nuclear (ROSSO et al., 2012). Além disso, Schwartz et al. (SCHWARTZ et al., 2002) demonstraram que a 1,25-D₃ estimula atividade específica das MAPKs em células da zona de crescimento de condrócitos devido a ativação da ERK 1/2, envolvendo fosforilação rápida. A 1,25-D₃ aumenta a atividade da MAPK via PLC e aumenta a produção de prostaglandinas, regulando a fisiologia da zona de crescimento dos condrócitos por meio de vias rápidas de sinalização mediadas por membrana (SCHWARTZ et al., 2002). Estudos anteriores indicam que a 1,25-D₃ atua através da via MAPK, influenciando a síntese proteica no tecido muscular esquelético, principalmente no aumento da expressão de transportadores GLUT4 (GOMES CASTRO et al., 2014).

Em resumo, a despolarização da membrana plasmática é necessária para o aumento do influxo de cálcio e secreção de insulina, mediados pela 1,25-D₃. Estes resultados sugerem que o efeito secretagogo da 1,25-D₃ é dependente do aumento no influxo de cálcio, principalmente pelos VDCC, canais de K⁺-Ca²⁺ e canais de K⁺-ATP, mas também com a participação dos receptores RYR e IP₃, PKA e PKCs convencionais na sua via de sinalização. Além disso, o envolvimento dos canais de K⁺ sensíveis ao TEA na fase de repolarização do potencial de membrana vincula a ação da 1,25-D₃ na exocitose regulada das vesículas de insulina, acoplada à rápida resposta ao influxo de cálcio, também mediada pela ativação da via de sinalização MAPK/ERK 1/2.

Os compostos LUM e VDX foram avaliados de acordo com as previsões ADMET através das plataformas SwissADME e ADMETLab. Como esperado, as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas preditas foram semelhantes aos dados relatados quando um

software equivalente foi aplicado (DEB; REEVES; LAFORTUNE, 2020). A importância das propriedades físico-químicas e características estruturais de um composto reflete no controle do metabolismo. Além disso, esses parâmetros também afetam o transporte das moléculas VDX e LUM através das membranas plasmáticas. É importante ressaltar que eles refletem em parâmetros farmacocinéticos, como a concentração plasmática e a meia-vida do fármaco (GAD, 2008). Curiosamente, embora a molécula já seja usada clinicamente por décadas, informações relativas as propriedades físico-químicas dos derivados da vitamina D₃ ainda são limitados na literatura.

O perfil ADMET mostrou semelhanças entre os ligantes LUM e VDX. No entanto, é importante destacar que o grupo hidroxila adicional em VDX permitiu um maior número de interações com diferentes resíduos nas proteínas estudadas. De acordo com as previsões físico-químicas, ambos os ligantes participaram como doadores e também como aceptores. Além disso, LUM e VDX se situaram dentro da pontuação aceitável de semelhança à fármaco.

As redes de parceiras fisiológicas são importantes pois representam visualmente uma vasta gama de interações complexas relacionadas a várias entidades distintas. Estes dados vêm de redes geradas pela base de dados STRING com pontuações combinadas baseadas em níveis de confiança já publicados (SZKLARCZYK et al., 2015, 2021). Como esperado, as proteínas estudadas (ERp57 e PKC) foram confirmadas computacionalmente como parceiras fisiológicas. De fato, as mais altas pontuações (scores) combinadas foram preditas para ERK1/2 e PKC. Além disso, o tratamento *in vitro* de ilhotas pancreáticas isoladas com 1,25-D₃ aumentou a cascata de sinalização e fosforilação da proteína MAPK/ERK1/2 provavelmente de maneira dependente de PKC, conforme já relatado.

Os resultados das simulações de dinâmica molecular predisseram interações e energias relacionadas que confirmaram a estabilidade dos complexos estudados. Além disso, as ligações de hidrogênio entre proteína-ligante e as contribuições hidrofóbicas mantiveram a estabilidade de cada complexo. Esses resultados refletiram em uma ligeira variação dos valores RMSD preditos durante as simulações computacionais. Ambas as estruturas de ligantes interagiram com resíduos de proteínas de acordo com o potencial eletrostático calculado e superfícies hidrofóbicas. Conforme predito *in silico*, o receptor ERp57 apresentou maior número de interações com o isômero 6-*s-cis* (LUM), confirmando a especificidade desta molécula apontada na literatura. Embora os resultados das simulações confirmem que a ERp57 também pode interagir com o isômero 6-*s-trans* (VDX).

As predições *in silico* mostraram que a ligação da 1,25-D₃ com a ERp57 e, subsequentemente com a PKC, pode ativar a via de sinalização MAPK/ERK1/2. Além disso, esta via de sinalização pode modular a transcrição / expressão gênica, incluindo o gene da insulina (KHOO et al., 2003). Coletivamente, os efeitos da 1,25-D₃ relacionados a via da MAPK, podem levar à regulação a jusante ou a montante dos genes responsáveis pela sobrevivência das células β (Costes et al. 2006). Alternativamente, a via MAPK/ERK1/2 está associada à proliferação celular, diferenciação, migração, senescência e apoptose (Sun et al. 2015). Assim, esta via poderia apontar conexões importantes com o metabolismo da vitamina D, uma vez que alguns efeitos da 1,25-D₃ são mediados por ERK1/2 ativada dependente de PKC (Schwartz et al. 2001b). Além disso, a PKC também pode ser ativada pela 1,25-D₃ (Doroudi, Schwartz e Boyan 2015). Outros estudos mostraram que a interação da 1,25-D₃ com *mVDR* medeia a ativação de PKC. Finalmente, a ativação de PKC depende da produção de diacilglicerol (DAG) dependente da fosfolipase C (PLC). Este mecanismo por trás da 1,25-D₃ também pode aumentar a atividade da via MAPK (Schwartz et al. 2002).

Deve-se notar que PKC pode iniciar uma cascata de fosforilação, resultando na ativação de MAPK e na modulação subsequente da expressão gênica (Schwartz et al. 2002). Assim, sob o estímulo 1,25-D₃, uma fosforilação sequencial das proteínas MAPK permite que elas entrem no ambiente nuclear. Então, essas proteínas agem como fatores de transcrição resultando na modulação de genes específicos (Schwartz et al. 2001b).

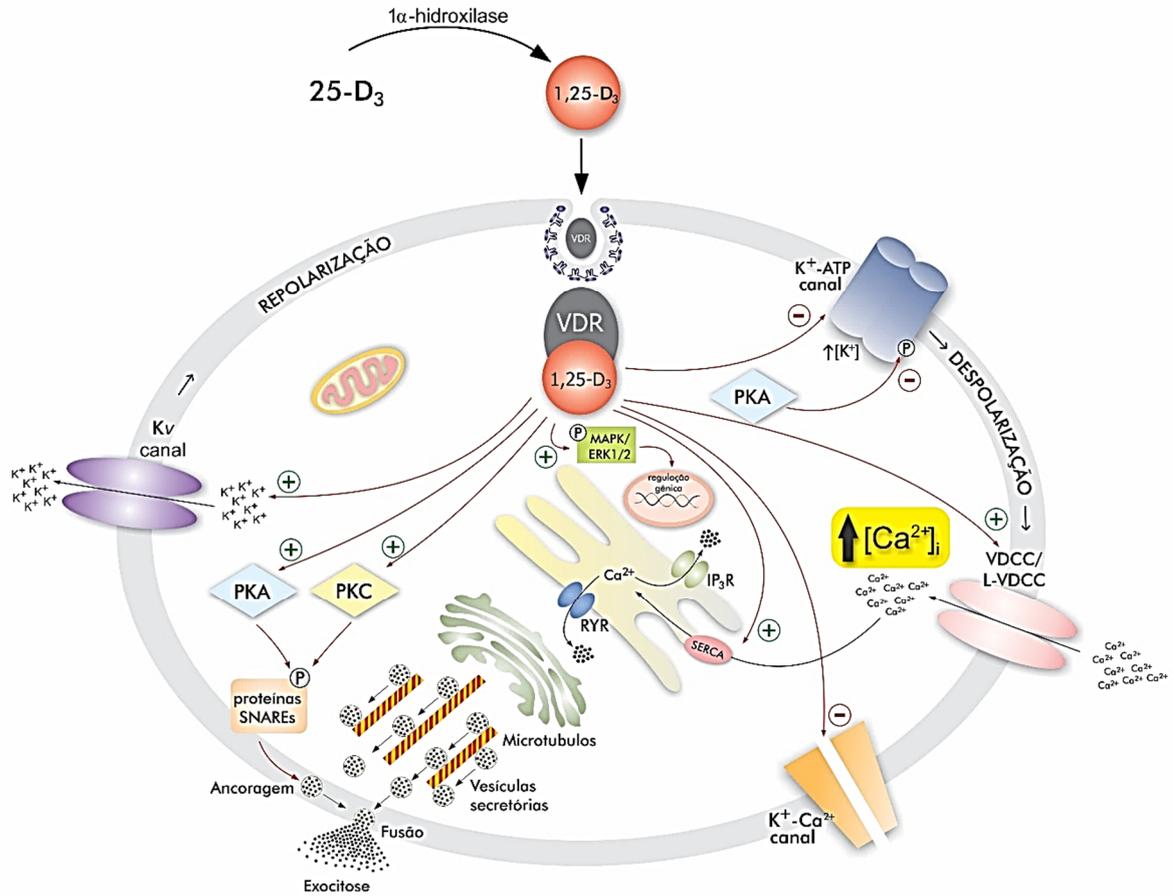
Os dados preditos neste estudo foram consistentes com as respostas não genômicas suportadas pela forma ativa da vitamina D₃ (1,25-D₃) se ligando ao receptor associado à membrana ERp57 em ambas as conformações 6-*s-cis* (LUM), bem como, 6-*s-trans* (VDX) para desencadear a ativação de proteínas a jusante, como PKC, e contribuindo para a sobrevivência das células β.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo foi mostrado que o tratamento a curto prazo (5 dias) com 1,25-D₃, mas não com o colecalciferol, diminuiu a resistência à insulina induzida pela dexametasona em ratos. O tratamento com 1,25-D₃ melhorou o perfil de enzimas hepáticas, lipídios e cálcio sérico, sugerindo efeito protetor da 1,25-D₃, principalmente no fígado. Além disso, a 1,25-D₃ estimulou a exocitose regulada para secreção de insulina em uma abordagem *in vitro*, estabelecendo o papel de secretagogo, juntamente com efeito estimulatório na ativação da via MAPK/ERK1/2, sugerindo o envolvimento dessas proteínas no mecanismo de ação da 1,25-D₃. Estes resultados sugerem que o efeito estimulatório da 1,25-D₃ na secreção de insulina envolve a ativação dos canais VDCC do tipo L, K⁺-ATP e K⁺-Ca²⁺ que desencadeiam o aumento da despolarização celular e do cálcio citosólico. Estas alterações iônicas também envolvem a participação do cálcio intracelular dos estoques que levam à ativação à jusante de PKC e PKA. A exocitose regulada de vesículas secretórias de insulina representa uma nova via de sinalização da 1,25-D₃ mediada por proteínas do citoesqueleto e do complexo SNARE, que orientam o tráfego vesicular e catalisam a fusão vesicular na membrana plasmática. Além disso, após aumento abrupto intracelular de cálcio e secreção de insulina, a ativação adicional dos canais de K_v pode ser crucial para a repolarização celular. Em resumo, estes resultados apontam um conjunto de proteínas e canais como alvos potenciais que sustentam o uso da vitamina D₃, para a terapia do diabetes e/ou resistência à insulina em um futuro próximo.

Este trabalho sustenta que as proteínas estudadas *in silico* (ERp57 e PKC) e 1,25-D₃ obtiveram interações energéticas favoráveis. Além disso, a estabilidade dos complexos proteína-ligante se refletiu na menor variação dos valores RMSD preditos durante as simulações computacionais. Tais descobertas provavelmente refletem a ocorrência do complexo ERp57-1,25-D₃ nas células β pancreáticas. Assim, este receptor poderia iniciar a via relacionada com respostas intracelulares rápidas, ativando alvos a jusante. Além disso, durante esta cascata de sinalização, a 1,25-D₃ pode interagir com a PKC como predito *in silico*. Esses achados teóricos podem explicar a transdução de sinal amplificada e o aumento da ativação da proteína MAPK/ERK1/2 por meio da fosforilação. Ao todo, esses resultados podem refletir na secreção de insulina de forma direta ou indireta.

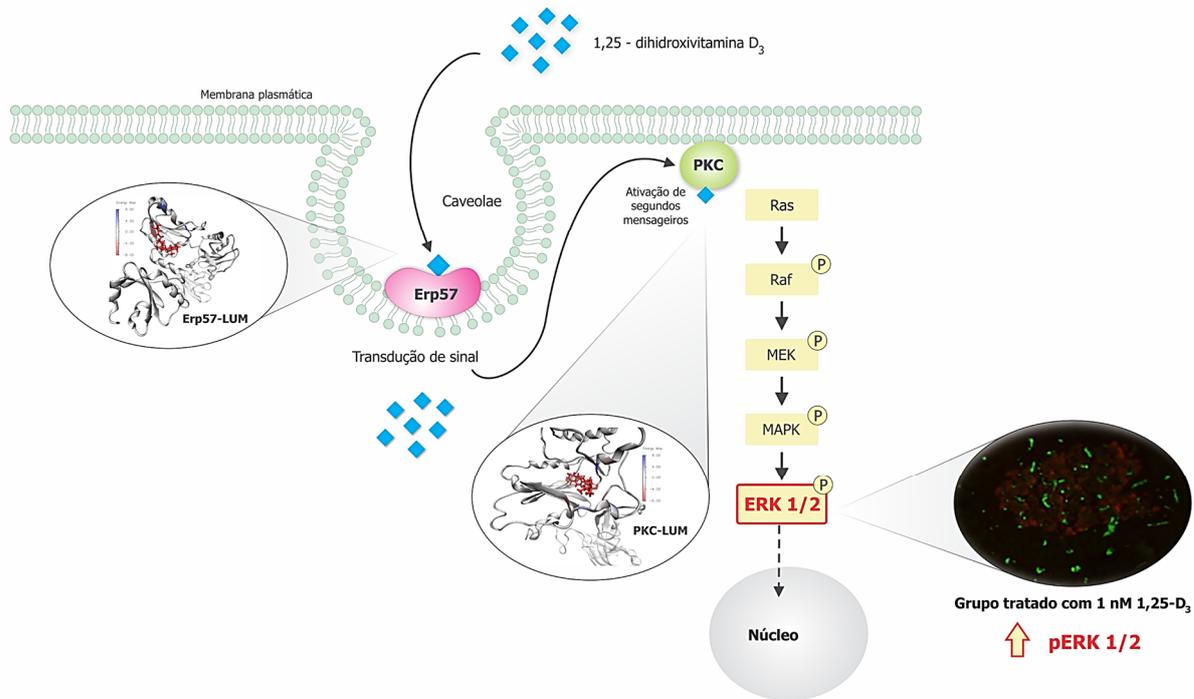
FIGURA 34 - Mecanismo de ação proposto para 1,25-D₃ no influxo de cálcio, nas células β pancreáticas, que desencadeiam a excitose regulada das vesículas de insulina e a secreção hormonal.



A vitamina D₃ (25-D₃) é convertida endogenamente em 1,25-D₃ pelas enzimas α -hidroxilases. A 1,25-D₃ se liga a proteína de ligação VDR (associado ao caveolae de membrana ou citoplasmático) e entra na célula β pancreática para gerar os efeitos genômicos (respostas lentas) e não genômicos (respostas rápidas). A 1,25-D₃ estimula a secreção de insulina através da influência em diferentes canais, modulando o influxo de cálcio e a concentração de cálcio intracelular. A 1,25-D₃ atua no bloqueio dos canais de K⁺-ATP, aumentando a carga positiva no interior da célula, gerando diferença de potencial elétrico e a despolarização da membrana plasmática. Com isso, os canais VDCC ou L-VDCC são ativados e se abrem para permitir a entrada de cálcio para o interior da célula. A 1,25-D₃ também atua inibindo os canais K⁺-Ca²⁺ e no aumento do cálcio intracelular. O aumento abrupto de cálcio, assim como a 1,25-D₃, ativam a bomba SERCA, mobilizando a concentração de cálcio dos estoques do retículo, via receptores de rianodina (RyR) e receptores IP₃ (IP₃R). O aumento de cálcio intracelular leva a mobilização de vesículas secretórias contendo grânulos de insulina, que serão encaminhadas aos sítios excitotóxicos também através dos microtúbulos. Na membrana plasmática essas vesículas se aderem e se fundem, com auxílio das proteínas SNAREs, que permitiram que ocorresse o processo de excitose e a liberação dos grânulos de insulina. A 1,25-D₃ também ativa PKA e PKC que atuam fosforilando e ativando proteínas SNAREs. PKA ativada também atua na fosforilação e bloqueio dos canais de K⁺-ATP, contribuindo para a despolarização da membrana plasmática e abertura dos VDCC. Após o evento excitotóxico, a 1,25-D₃ atua na repolarização celular, ativando os canais Kv, e permitindo a saída de carga positiva do interior da célula. 1,25-D₃ fosforila e ativa a via de sinalização MAPK/ERK1/2, que por sua vez, irá atuar no núcleo regulando genes responsáveis pela diferenciação e crescimento celular.

Fonte: O Autor.

FIGURA 35 – Interações preditas entre os ligantes LUM (1,25-D₃ conformação 6-*s-cis*) e VDX (1,25-D₃ conformação 6-*s-trans*) e as proteínas ERp57 e PKC que contribuem para a ativação da via de sinalização MAPK/ERK1/2.



A 1,25-D₃ na conformação 6-*s-cis* (LUM) ou 6-*s-trans* (VDX) interage com o receptor ERp57 localizado nas caveolae da membrana plasmática das células β pancreáticas. Esta interação é capaz de ativar algumas vias de sinalização intracelulares através de segundos mensageiros, dentre eles a PKC. A 1,25-D₃ também pode interagir com a PKC no ambiente intracelular e ativar a cascata de sinalização da via MAPK/ERK1/2 através de fosforilações subsequentes. Esta sinalização é direcionada ao ambiente nuclear da célula e ativa vias transcricionais, dentre elas, do gene da insulina. Estas vias moduladas por ERK1/2 também atuam na proliferação celular, diferenciação, migração, senescência e apoptose, que contribuem para a sobrevivência das células β pancreáticas.

Fonte: O Autor.

8 ARTIGO PUBLICADO

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry 99 (2022) 108864

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

RESEARCH PAPER

1 α ,25-(OH)₂ vitamin D₃ prevents insulin resistance and regulates coordinated exocytosis and insulin secretion

Ana Karla Bittencourt Mendes^a, Paola Miranda Sulis^a, Fernanda Carvalho Cavalari^{a,b},
Diana Patricia Rey Padilla^c, Marcela Aragón^c, Joana Margarida Gaspar^a,
Fátima Regina Mena Barreto Silva^{a,b,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Núcleo de Bioeletricidade Celular (NUBIOCEL), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Florianópolis- SC, Brazil

^bNúcleo de Bioeletricidade Celular (NUBIOCEL), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Florianópolis- SC, Brazil
^cUniversidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Bogotá, D. C., Colombia

Received 10 November 2020; received in revised form 13 September 2021; accepted 15 September 2021

Abstract

Vitamin D₃ is associated with improvements in insulin resistance and glycemia. In this study, we investigated the short-term effect of 1 α ,25(OH)₂ Vitamin D₃ (1,25-D₃) and cholecalciferol (vitamin D₃) on the glycemia and insulin sensitivity of control and dexamethasone-induced insulin-resistance rats. ⁴⁵Ca²⁺ influx responses to 1,25-D₃ and its role in insulin secretion were investigated in isolated pancreatic islets from control rats. *In vivo*, 5 d treatment with 1,25-D₃ (*i.p.*) prevented insulin resistance in dexamethasone-treated rats. Treatment with 1,25-D₃ improved the activities of hepatic enzymes, serum lipids and calcium concentrations in insulin-resistant rats. 25-D₃ (*o.g.*) does not affect insulin resistance. In pancreatic islets, 1,25-D₃ increased insulin secretion and stimulated rapid response ⁴⁵Ca²⁺ influx. The stimulatory effect of 1,25-D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx was decreased by diazoxide, apamine, thapsigargin, dantrolene, 2-APB, nifedipine, TEA, PKA, PKC, and cytoskeleton inhibitor, while it was increased by glibenclamide and *N*-ethylmaleimide. The stimulatory effect of 1,25-D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx involves the activation of L-type VDCC, K⁺-ATP, K⁺-Ca²⁺ and Kv channels, which augment cytosolic calcium. These ionic changes mobilize calcium from stores and downstream activation of PKC, PKA tethering vesicle traffic and fusion at the plasma membrane for insulin secretion. This is the first study highlighting the unprecedented role of 1,25-D₃ (short-term effect) in the regulation of glucose homeostasis and on prevention of insulin resistance. Furthermore, this study shows the intracellular β -cell signal transduction of 1,25-D₃ through the modulation of pivotal ionic channels and proteins exhibiting a coordinated exocytosis of vesicles for insulin secretion.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: 1 α ,25(OH)₂ Vitamin D₃; Calcium; Hyperglycemia; Type 2 Diabetes; Pancreatic β -cell.

1. Introduction

Vitamin D₃ comprises a family of fat-soluble molecules, named secosteroids [1]. Vitamin D₃ can be obtained exogenously (10–20%), from the diet, or endogenously (80–90%) from the skin, through sunlight exposure [2,3]. 1 α ,25(OH)₂ Vitamin D₃ (1,25-D₃) is the most active metabolite of vitamin D₃ and acts by the interaction with the nuclear vitamin D receptor (VDR) [4].

Numerous studies have demonstrated that vitamin D₃ has beneficial effects on several metabolic diseases, especially in insulin resistance (IR) and type II diabetes *mellitus* (T2DM) [5–7]. T2DM is a metabolic condition mainly characterized by hyperglycemia, due to impaired insulin action and secretion through pancreatic β -cell dysfunction [8]. In T2DM occurs a reduction in β -cell mass, as well as, failure in intracellular signaling mechanisms, namely in ATP / Ca²⁺ signaling [9]. Previous studies have shown that vita-

Abbreviations: 1-25-D₃, 1 α ,25(OH)₂ Vitamin D₃; 25-D₃, cholecalciferol; TEA, tetraethylammonium; 2-APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate; IR, insulin resistance; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; L-type VDCC, voltage-dependent calcium channel L-type; K⁺-ATP, ATP-dependent potassium channel; K⁺-Ca²⁺, calcium-dependent potassium channel; Kv, voltage-dependent potassium channel; SNAREs, *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor.

* Corresponding author at: Fátima Regina Silva, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Centro de Ciências Biológicas, Bairro Trindade, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Phone: +55 (48) 37216912; Fax: +55 (48) 37219692.

E-mail address: mena.barreto@ufsc.br (F.R.M.B. Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108864>
0955-2863/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Prosseguir com os estudos de simulação de *docking* e dinâmica molecular para a proteína L-VDCC (canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L) e os ligantes LUM e VDX, afim de identificar sítios de interação, cavidades, resíduos de aminoácidos e energias envolvidas nas interações proteína-ligantes;
- Utilizar novas bases de dados e softwares que permitirão a otimização de moléculas e melhor qualidade de análise das simulações *in silico*;
- Quantificar, pela técnica de *Western Blotting*, as proteínas VAMP 1/2/3, caveolina1 e proteínas envolvidas na apoptose e proliferação celular, afim de caracterizar o efeito pró-apoptótico e anti-proliferativo da 1,25-D₃, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos, tratados ou não (controle) com 1,25-D₃ *in vivo*;
- Estudar o papel da 1,25-D₃ no metabolismo mitocondrial de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos.
- Caracterizar o envolvimento iônico nas vias de sinalização da 1,25-D₃ nas células β pancreáticas e que culminam na secreção de insulina através da técnica de *patch clamp*.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. **Diabetes care**, 2020.

ABRAHAM, M. J. et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.

ALMASMOUM, H. et al. Protective effect of Vitamin D3 against lead induced hepatotoxicity, oxidative stress, immunosuppressive and calcium homeostasis disorders in rat. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 72, 2019.

ALTENHOFEN, D. et al. Bis-Pyrano Prenyl Isoflavone Improves Glucose Homeostasis by Inhibiting Dipeptidyl Peptidase-4 in Hyperglycemic Rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2017.

ANDERSON, J. L. et al. Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. **American Journal of Cardiology**, v. 106, n. 7, p. 963–968, 2010.

BARCA, G. M. J. et al. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **Journal of Chemical Physics**, v. 152, n. 15, 2020.

BENETTI, E. et al. Effects of Vitamin D on insulin resistance and myosteatorsis in diet-induced obese mice. **PLoS ONE**, 2018.

BERRY, D. M. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates expression and translocation of protein kinase C α and C δ via a nongenomic mechanism and rapidly induces phosphorylation of a 33-kDa protein in acute promyelocytic NB4 cells. **Journal of Biological Chemistry**, 1996.

BISHOP, J. E. et al. Profile of ligand specificity of the vitamin D binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin d3 and its analogs. **Journal of Bone and Mineral Research**, 1994.

BLAND, R. et al. **Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in pancreatic islets.** Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. **Anais...**2004

BORISSOVA, A. M. et al. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **International journal of clinical practice**, 2003.

BOUCHER, B. J. et al. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in East London Asians. **Diabetologia**, 1995.

BOUILLON, R. et al. Structure-Function Relationships in the Vitamin D Endocrine System. **Endocrine Reviews**, 1995.

BOURLON, P. M.; BILLAUDEL, B.; FAURE-DUSSERT, A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the

rat endocrine pancreas. **Journal of Endocrinology**, 1999.

BRUNGER, A. T. et al. **Ca²⁺-Triggered Synaptic Vesicle Fusion Initiated by Release of Inhibition** **Trends in Cell Biology**, 2018.

BUITRAGO, C.; PARDO, V. G.; BOLAND, R. **Role of VDR in 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells** **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2013.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, 2007.

CADE, C.; NORMAN, A. W. Vitamin d₃ improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin d-deficient rat in vivo. **Endocrinology**, 1986.

CADE, W. T. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. **Physical Therapy**, v. 88, n. 11, p. 1322–1335, 2008.

CANDIOTTO, G. et al. Emission redshift in DCM2-doped Alq₃ caused by nonlinear Stark shifts and Förster-mediated exciton diffusion. **Physical Review B**, v. 102, n. 23, 2020.

CARTER, A. B.; MONICK, M. M.; HUNNINGHAKE, G. W. Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 1999.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2002.

CASTRO, A. J. G. et al. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 1, p. 51–61, 2015a.

CASTRO, A. J. G. et al. Acute effect of 3 β -hidroxihop-22(29)ene on insulin secretion is mediated by GLP-1, potassium and calcium channels for the glucose homeostasis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2015b.

CEFALO, C. M. A. et al. Effect of Vitamin D Supplementation on Obesity-Induced Insulin Resistance: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. **Obesity**, 2018.

CHEN, C. et al. The vitamin D receptor (VDR) protects pancreatic beta cells against Forkhead box class O1 (FOXO1)-induced mitochondrial dysfunction and cell apoptosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 117, 2019.

CHEN, J. et al. Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses to 1 α ,25(OH)₂D₃. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p. 2362–2373, 1 dez. 2013.

CHENG, Q.; BOUCHER, B. J.; LEUNG, P. S. Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin-angiotensin system in mice. **Diabetologia**, v. 56, n. 3, p. 553–562, 2013.

CHHEDA, M. G. et al. Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the

SNARE complex. **Nature Cell Biology**, 2001.

CHOI, M. et al. Vitamin D3 supplementation modulates inflammatory responses from the muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats. **Cytokine**, 2013.

CHOW, E. C. Y. et al. Temporal changes in tissue $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3, vitamin D receptor target genes, and calcium and PTH levels after $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2013.

DA LUZ, G. et al. Triterpene derivative: A potential signaling pathway for the fern- $9(11)$ -ene- $2\alpha,3\beta$ -diol on insulin secretion in pancreatic islet. **Life Sciences**, v. 154, p. 58–65, 2016.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. ILOGP: A simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 12, p. 3284–3301, 2014.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, p. 1117–1121, 2016.

DASTORANI, M. et al. The effects of vitamin D supplementation on metabolic profiles and gene expression of insulin and lipid metabolism in infertile polycystic ovary syndrome candidates for in vitro fertilization. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2018.

DE BOLAND, A. R.; NORMAN, A. W. Influx of extracellular calcium mediates $1, 25$ -dihydroxyvitamin D3-dependent transcaltachia (The rapid stimulation of duodenal Ca^{2+} transport). **Endocrinology**, v. 127, n. 5, p. 2475–2480, 1990.

DE RUITER, A.; OOSTENBRINK, C. **Advances in the calculation of binding free energies****Current Opinion in Structural Biology**, 2020.

DEB, S.; REEVES, A. A.; LAFORTUNE, S. Simulation of physicochemical and pharmacokinetic properties of vitamin d3 and its natural derivatives. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1–16, 2020.

DELGADO, C. et al. Calcitriol ($1,25$ -dihydroxyvitamin D3) increases L-type calcium current via protein kinase A signaling and modulates calcium cycling and contractility in isolated mouse ventricular myocytes. **Heart Rhythm**, 2017a.

DELGADO, C. et al. Calcitriol ($1,25$ -dihydroxyvitamin D3) increases L-type calcium current via protein kinase A signaling and modulates calcium cycling and contractility in isolated mouse ventricular myocytes. **Heart Rhythm**, v. 14, n. 3, p. 432–439, 2017b.

DIMITRIADIS, G. et al. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. **Biochemical Journal**, 1997.

DING, C.; WILDING, J. P. H.; BING, C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ Protects against Macrophage-Induced Activation of NF κ B and MAPK Signalling and Chemokine Release in Human Adipocytes. **PLoS ONE**, 2013.

DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLER, J. A. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 54, n. 2, p. 720–723, 1971.

DOLENŠEK, J.; SKELIN, M.; RUPNIK, M. S. **Calcium dependencies of regulated exocytosis in different endocrine cells** **Physiological Research**, 2011.

DOMINICZAK, M. H.; CASLAKE, M. J. **Apolipoproteins: Metabolic role and clinical biochemistry applications** **Annals of Clinical Biochemistry**, 2011.

DONG, G. et al. Insights into MHC Class I Peptide Loading from the Structure of the Tapasin-ERp57 Thiol Oxidoreductase Heterodimer. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 21–32, 2009.

DONG, J. et al. Admetlab: A platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **Journal of Cheminformatics**, v. 10, n. 1, 2018.

DUNCAN, B. B. et al. The burden of diabetes and hyperglycemia in Brazil and its states: Findings from the Global Burden of Disease Study 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 2017.

EASOM, R. A. β -granule transport and exocytosis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2000.

EL-FAKHRI, N. et al. **Vitamin D and its effects on glucose homeostasis, cardiovascular function and immune function** **Hormone Research in Paediatrics**, 2014.

EL-MANSI, A. A.; AL-KAHTANI, M. A. Calcitriol and Punica granatum extract concomitantly attenuate cardiomyopathy of diabetic mother rats and their neonates via activation of Raf/MEK/ERK signalling and mitigation of apoptotic pathways. **Folia Biologica (Czech Republic)**, 2019.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714–3717, 2000.

FÄHRROLFES, R. et al. Proteins Plus: A web portal for structure analysis of macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W337–W343, 2017.

FARIAS, A. B. et al. Targeting Nsp9 as an anti-SARS-CoV-2 strategy. **New Journal of Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 522–525, 2021.

FELDMAN, J. D.; PIKE, J. W.; ADAMS, J. S. **Vitamin D**. [s.l: s.n.].

FERNÁNDEZ-JUÁREZ, G. et al. 25 (OH) vitamin D levels and renal disease progression in patients with type 2 diabetic nephropathy and blockade of the renin-angiotensin system. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, 2013.

FINDEISEN, F. et al. Stapled Voltage-Gated Calcium Channel (CaV) α -Interaction Domain (AID) Peptides Act As Selective Protein-Protein Interaction Inhibitors of CaV Function. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 1313–1326, 2017.

FREDERICO, M. et al. Acylhydrazones Contribute to Serum Glucose Homeostasis Through Dual Physiological Targets. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2049–2058, 2013.

FREDERICO, M. J. S. et al. Mechanism of action of camphoryl-benzene sulfonamide derivative on glucose uptake in adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2018.

FU, Y. et al. Basal and β -adrenergic regulation of the cardiac calcium channel CaV1.2 requires phosphorylation of serine 1700. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 46, p. 16598–16603, 2014.

GAD, S. C. **Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties**. [s.l.: s.n.].

GAO, Y. et al. Vitamin D and incidence of prediabetes or type 2 diabetes: A four-year follow-up community-based study. **Disease Markers**, 2018.

GAUCCI, E. et al. Analysis of the interaction of calcitriol with the disulfide isomerase ERp57. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

GEORGE, N. et al. Effect of vitamin D₃ in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 8, p. 1410–1418, 2012.

GILAD, L. A. et al. Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen-induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells. **Journal of Endocrinology**, 2005.

GILLIS, K. D.; MÖSSNER, R.; NEHER, E. Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. **Neuron**, v. 16, n. 6, p. 1209–1220, 1996.

GILON, P. et al. Calcium signaling in pancreatic β -cells in health and in Type 2 diabetes. **Cell Calcium**, v. 56, n. 5, p. 340–361, 2014.

GOMES CASTRO, A. J. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 48, n. 1, p. 18–27, 2014.

GOMES CASTRO, A. J. et al. The potent insulin secretagogue effect of betulinic acid is mediated by potassium and chloride channels. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 648, n. December 2017, p. 20–26, 2018.

GRODSKY, G. M.; BENNETT, L. L. Cation requirements for insulin secretion in the isolated

perfused pancreas. **Diabetes**, 1966.

GUERRERO-VALERO, M. et al. Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6603–6607, 2009.

GUSTAVO VAZQUEZ-JIMENEZ, J. et al. Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. **Cellular Signalling**, v. 28, n. 1, p. 53–59, 2016.

HALPERN, A. et al. Metabolic syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: From diagnosis to treatment. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 2, n. 1, p. 1–20, 2010.

HAUSSLER, M. R. et al. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D 3: Genomic and non-genomic mechanisms. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 543–559, 2011.

HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1751–1760, 2000.

HENQUIN, J. C. **Regulation of insulin secretion: A matter of phase control and amplitude modulation** *Diabetologia*, 2009.

HENQUIN, J. C. et al. Dynamics of glucose-induced insulin secretion in normal human islets. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 7, p. E640–E650, 2015.

HENRY, H. L. **Regulation of vitamin D metabolism** *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2011.

HOU, J. C.; MIN, L.; PESSIN, J. E. **Chapter 16 Insulin Granule Biogenesis, Trafficking and Exocytosis** *Vitamins and Hormones*, 2009.

HSIN, J. et al. **Using VMD: An introductory tutorial** *Current Protocols in Bioinformatics*, 2008.

HUANG, X. J. et al. **Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques** *Sensors*, 2006.

HUANG, Y. N. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D $_3$ attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. **Journal of Neuroinflammation**, 2015.

HUGILL, A.; SHIMOMURA, K.; COX, R. D. Islet Insulin Secretion Measurements in the Mouse. **Current protocols in mouse biology**, 2016.

HUMMEL, D. et al. The vitamin D system is deregulated in pancreatic diseases. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2014.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal**

of **Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

HUSSAIN GILANI, S. Y. et al. Obesity And Diabetes As Determinants Of Vitamin D Deficiency. **Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC**, 2019.

IDEVALL-HAGREN, O.; TENGHOLM, A. **Metabolic regulation of calcium signaling in beta cells** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2020.

IGUMENOVA, T. I. Dynamics and Membrane Interactions of Protein Kinase C. **Biochemistry**, v. 54, n. 32, p. 4953–4968, 2015.

INGELFINGER, J. R.; JARCHO, J. A. **Increase in the incidence of diabetes and its implications** *New England Journal of Medicine*, 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium**. [s.l: s.n.].

JAYANARAYANAN, S. et al. Vitamin D3 supplementation increases insulin level by regulating altered IP3 and AMPA receptor expression in the pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 1041–1049, 2015.

JOHNSON, D. A. et al. Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2243–2270, 2001.

JONES, G. **Pharmacokinetics of vitamin D toxicity** *American Journal of Clinical Nutrition*, 2008.

JORDE, R.; GRIMNES, G. Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 4, p. 303–312, 2011.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983.

KADOWAKI, S.; NORMAN, A. W. Demonstration that the vitamin D metabolite 1,25(OH)₂-vitamin D₃ and not 24R,25(OH)₂-vitamin D₃ is essential for normal insulin secretion in the perfused rat pancreas. **Diabetes**, 1985.

KAJIKAWA, M. et al. An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca²⁺ concentration in pancreatic β-cells through nongenomic signal transduction. **Endocrinology**, v. 140, n. 10, p. 4706–4712, 1999.

KAPPEL, V. D. et al. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. **Molecules**, 2012.

KAPPEL, V. D. et al. The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: Potential insulin secretagogue effect. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, n. 1–3, p. 264–268, 2013.

KHODABANDEHLOO, H. et al. **Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and β -cell dysfunction.** [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 167

KHOO, S. et al. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic β cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 32969–32977, 2003.

KITA, K. et al. Evidence for phosphorylation of rat liver glucose-regulated protein 58, GRP58/ERp57/ER-60, induced by fasting and leptin. **FEBS Letters**, v. 580, n. 1, p. 199–205, 2006.

KJALARSDOTTIR, L. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances glucose-stimulated insulin secretion in mouse and human islets: a role for transcriptional regulation of voltage-gated calcium channels by the vitamin D receptor. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 185, n. June 2018, p. 17–26, 2019.

KNEKT, P. et al. Serum vitamin D and subsequent occurrence of type 2 diabetes. **Epidemiology**, v. 19, n. 5, p. 666–671, 2008.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 1, p. 17–23, 1962.

KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 7, p. 1951–1962, 2014.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. **Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update** *Physiological Reviews*, 2012.

LACY, P. E.; WALKER, M. M.; FINK, C. J. Perfusion of isolated rat islets in vitro. Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. **Diabetes**, v. 21, n. 10, p. 987–998, 1972.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011.

LEE, S. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and pancreatic β -cell function: Vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. **Endocrinology**, 1994.

LEMIEUX, P. et al. Effects of 6-month Vitamin D supplementation on insulin sensitivity and secretion: A randomised, placebo-controlled trial. **European Journal of Endocrinology**, 2019.

LEMKUL, J. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, 2019.

LEONARD, T. A. et al. Crystal structure and allosteric activation of protein kinase C β II. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 55–66, 2011.

LI, W. et al. Vitamin D inhibits palmitate-induced macrophage pro-inflammatory cytokine production by targeting the MAPK pathway. **Immunology Letters**, 2018.

LIEN, C. F. et al. **Potential Role of Protein Kinase C in the Pathophysiology of Diabetes-Associated Atherosclerosis** *Frontiers in Pharmacology*, 2021.

LIM, S. T. et al. Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C α (PKC α) increases focal adhesion localization of PKC α . *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 16, p. 13795–13802, 2003.

LIN, M. et al. Calcitriol regulates angiotensin-converting enzyme and angiotensin converting-enzyme 2 in diabetic kidney disease. *Molecular Biology Reports*, 2016.

LITTLETON, J. T. et al. SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001.

LORVAND AMIRI, H. et al. Effect of daily calcitriol supplementation with and without calcium on disease regression in non-alcoholic fatty liver patients following an energy-restricted diet: Randomized, controlled, double-blind trial. *Clinical Nutrition*, v. 36, n. 6, p. 1490–1497, 2017.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 1951.

MAESTRO, B. et al. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocrine Journal*, v. 47, n. 4, p. 383–391, 2000.

MAESTRO, B. et al. **Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Anais...*2003

MALAISSE, W. J. et al. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system. *Diabetes*, v. 20, n. 5, p. 257–265, 1971.

MALTA, D. C. et al. Prevalence of diabetes mellitus as determined by glycosylated hemoglobin in the Brazilian adult population, national health survey. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2019.

MATHIASSEN, I. S. et al. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 34, p. 30738–30745, 2002.

MEARS, D. **Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca²⁺ channels** *Journal of Membrane Biology*, 2004.

MEERZA, D.; NASEEM, I.; AHMED, J. Effect of 1, 25(OH)₂ vitamin D₃ on glucose homeostasis and DNA damage in type 2 diabetic mice. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2012.

MENDES, C. P. et al. Insulin stimulus-secretion coupling is triggered by a novel thiazolidinedione/sulfonylurea hybrid in rat pancreatic islets. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 1, p. 509–520, 2018.

MIKOSHIBA, K. **Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases** *Advances in Biological Regulation*, 2015.

MITRI, J.; PITTAS, A. G. **Vitamin D and diabetes** *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2014.

MIZWICKI, M. T.; NORMAN, A. W. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. **Science Signaling**, v. 2, n. 75, p. 1–15, 2009.

MONTANYA, E.; TÉLLEZ, N. Pancreatic remodeling: Beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size. **Methods in Molecular Biology**, 2009.

NAIR, R.; MASEEH, A. **Vitamin D: The sunshine vitamin** *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2012.

NAZIMEK-SIEWNIAK, B.; MOCZULSKI, D. K.; GRZESZCZAK, W. Risk of macrovascular and microvascular complications in Type 2 diabetes - Results of longitudinal study design. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 16, n. 4, p. 271–276, 2002.

NEHAR, D. et al. Tumor necrosis factor- α -stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. **Endocrinology**, 1997.

NEMERE, I. et al. **Identification and characterization of 1,25D3-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D3-MARRS) binding protein**. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **Anais...**2004

NORMAN, A. W. et al. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. **Science**, 1980.

NORMAN, A. W. et al. Selective Biological Response by Target Organs (Intestine, Kidney, and Bone) to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Two Analogues. **Cancer Research**, v. 53, n. 17, p. 3935–3942, 1993.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D - Fundamentals of the vitamin D system *AmJClinNutr* 2008.pdf. **Am J Clin Nutr**, 2008.

NORMAN, A. W. **The history of the discovery of vitamin d and its daughter steroid hormone** *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2012.

NORMAN, A. W.; MIZWICKI, M. T.; NORMAN, D. P. G. **Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model** *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004.

ORLOWSKI, M.; MEISTER, A. γ -Glutamyl-p-nitroanilide: A new convenient substrate for

determination and study of l- and d- γ -glutamyltranspeptidase activities. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, 1963.

PADARIYA, M. et al. Recognition dynamics of cancer mutations on the ERp57-tapasin interface. **Cancers**, v. 12, n. 3, 2020.

PANDEY, B.; ARIFUZZAMAN, S. Scalable Mining, Analysis, and Visualization of Protein-Protein Interaction Networks. **International Journal of Big Data Intelligence**, v. 6, n. 1, p. 1, 2019.

PAPAPOSTOLI, I.; LAMMERT, F.; STOKES, C. S. Effect of short-term vitamin D correction on hepatic steatosis as quantified by controlled attenuation parameter (CAP). **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 25, n. 2, p. 175–181, 2016.

PAPATHEODOROU, K. et al. **Complications of Diabetes 2017** **Journal of Diabetes Research**, 2018.

PEDERSEN, M. G.; TAGLIAVINI, A.; HENQUIN, J. C. Calcium signaling and secretory granule pool dynamics underlie biphasic insulin secretion and its amplification by glucose: Experiments and modeling. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 316, n. 3, p. E475–E486, 2019.

PERIASAMY, M.; KALYANASUNDARAM, A. **SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease** **Muscle and Nerve**, 2007.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. **Mechanisms of insulin action and insulin resistance** **Physiological Reviews**, 2018.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PEYOT, M. L. et al. β -cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: Secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced β -cell mass. **Diabetes**, v. 59, n. 9, p. 2178–2187, 2010.

PITTAS, A. G. et al. Review: The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 6, p. 2017–2029, 2007.

PITTAS, A. G. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and risk of incident type 2 diabetes in women. **Diabetes Care**, v. 33, n. 9, p. 2021–2023, 2010.

PONDA, M. P. et al. Vitamin D may not improve lipid levels: A serial clinical laboratory data study. **Circulation**, v. 126, n. 3, p. 270–277, 2012.

PRADA, M. P. et al. AKAP5 complex facilitates purinergic modulation of vascular L-type Ca^{2+} channel $\text{CaV}1.2$. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

PRENTKI, M.; MATSCHINSKY, F. M.; MADIRAJU, S. R. M. **Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion***Cell Metabolism*, 2013.

QIU, H.; MA, L.; FENG, F. PICK1 attenuates high glucose-induced pancreatic β -cell death through the PI3K/Akt pathway and is negatively regulated by miR-139-5p. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 522, n. 1, 2020.

RAI, V.; AGRAWAL, D. K. **Role of Vitamin D in Cardiovascular Diseases***Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2017.

RAMESAN, R. M.; SHARMA, C. P. **Challenges and advances in nanoparticle-based oral insulin delivery***Expert Review of Medical Devices*, 2009.

ROBINSON, L. J.; MARTIN, T. F. Docking and fusion in neurosecretion. **Current Opinion in Cell Biology**, 1998.

RORSMAN, P.; ASHCROFT, F. M. Pancreatic β -cell electrical activity and insulin secretion: Of mice and men. **Physiological Reviews**, 2018.

RORSMAN, P.; RENSTRÖM, E. **Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells***Diabetologia*, 2003.

ROSELL, M.; FERNÁNDEZ-RECIO, J. Docking-based identification of small-molecule binding sites at protein-protein interfaces. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3750–3761, 1 jan. 2020.

ROSSI, A. M. et al. **MAPK inhibition by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D3 in breast cancer cells. Evidence on the participation of the VDR and Src.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **Anais...**2004

ROSSO, A. et al. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D₃ stimulates rapid plasma membrane calcium influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 146–154, 2012.

RUTTER, G. A. et al. **Local and regional control of calcium dynamics in the pancreatic islet***Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2017.

RUZZIN, J.; WAGMAN, A. S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: Defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, 2005.

SAAD EL-DIN, S. et al. Active form of vitamin D analogue mitigates neurodegenerative changes in Alzheimer's disease in rats by targeting Keap1/Nrf2 and MAPK-38p/ERK signaling pathways. **Steroids**, 2020.

SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 3, n. 2, p. 198–210, 2013.

SAMELSON, B. K. et al. A-kinase anchoring protein 79/150 recruits protein kinase C to phosphorylate roundabout receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 22, p. 14107–14119, 2015.

SANTULLI, G. et al. Calcium release channel RyR2 regulates insulin release and glucose homeostasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 5, p. 1968–1978, 2015.

SCHAEFFER, H. J.; WEBER, M. J. Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. **Molecular and Cellular Biology**, 1999.

SCHÖNING-STIERAND, K. et al. ProteinsPlus: Interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W48–W53, 2020.

SCHWARTZ, Z. et al. Osteoblast response to titanium surface roughness and $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ is mediated through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2001.

SCHWARTZ, Z. et al. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and $24\text{R},25$ -dihydroxyvitamin D₃ modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. **Endocrinology**, 2002.

SEDEJ, S.; ROSE, T.; RUPNIK, M. cAMP increases Ca^{2+} -dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices. **Journal of Physiology**, 2005.

SEO, M. J. et al. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2015.

SERGEEV, I. N.; RHOTEN, W. B. $1, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic β -cell line. **Endocrinology**, 1995.

SEVERINO, C. et al. Low-dose dexamethasone in the rat: A model to study insulin resistance. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2002.

SHIMIZU, M. et al. 2-Substituted-16-ene-22-thia- $1\alpha,25$ -dihydroxy-26,27-dimethyl-19-norvitamin D₃ analogs: Synthesis, biological evaluation, and crystal structure. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 14, p. 6949–6964, 2008.

SINGH, R. K. et al. **Protein kinase C- α and the regulation of diverse cell responses** **Biomolecular Concepts**, 2017.

SNYDER, D. A.; KELLY, M. L.; WOODBURY, D. J. **SNARE complex regulation by phosphorylation** **Cell Biochemistry and Biophysics**, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Sociedade Brasileira de Diabetes Diretrizes 2017-2018**. [s.l.: s.n.].

SOUSA DA SILVA, A. W.; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. **BMC Research Notes**, v. 5, 2012.

STERLING, T.; KHANAL, R.; NEMERE, I. The $1,25$ dihydroxyvitamin D₃-membrane-

associated, rapid response steroid-binding receptor. **OA Biochemistry**, v. 1, n. 1, 2013.

SULIS, P. M. et al. Sulfonyl(thio)urea derivative induction of insulin secretion is mediated by potassium, calcium, and sodium channel signal transduction. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 7, p. 10138–10147, 2019.

SULLIVAN, J. C. et al. Rel homology domain-containing transcription factors in the cnidarian *Nematostella vectensis*. **Development Genes and Evolution**, v. 217, n. 1, p. 63–72, 2007.

SUN, G. et al. Altered calcium homeostasis is correlated with abnormalities of fasting serum glucose, insulin resistance, and β -cell function in the Newfoundland population. **Diabetes**, 2005.

SUN, X. et al. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in Japanese adults: a secondary analysis of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Nutrition Research**, 2016.

SUN, Y. et al. **Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis** *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2015.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2011: Functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 1, 2011.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D605–D612, 2021.

TENGHOLM, A. Cyclic AMP dynamics in the pancreatic β -cell. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 117, n. 4, p. 355–369, 2012.

THOMSON, S.; MAHADEVAN, L. C.; CLAYTON, A. L. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 1999.

TREXLER, A. J.; TARASKA, J. W. **Regulation of insulin exocytosis by calcium-dependent protein kinase C in beta cells** *Cell Calcium*, 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

TSIMPANOIANNIS, I. N. et al. Self-diffusion coefficient of bulk and confined water: a critical review of classical molecular simulation studies. **Molecular Simulation**, v. 45, n. 4–5, p. 425–453, 2019.

TURANO, C. et al. **ERp57/GRP58: A protein with multiple functions** *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2011.

TURBAN, S.; HAJDUCH, E. **Protein kinase C isoforms: Mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance** *FEBS Letters*, 2011.

UPRETI, V. et al. Effect of oral vitamin D supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus with coexisting hypovitaminosis D: A parallel group placebo controlled randomized controlled pilot study. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, 2018.

VAN OBBERGHEN, E. et al. Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. I. Effect of cytochalasin B. **The Journal of clinical investigation**, v. 52, n. 5, p. 1041–1051, 1973.

VOETS, T. Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. **Neuron**, 2000.

VOETS, T.; NEHER, E.; MOSER, T. Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. **Neuron**, 1999.

WANG, Y.; DELUCA, H. F. Is the vitamin D receptor found in muscle? **Endocrinology**, 2011.

WANG, Z. et al. **Interplay between vitamin D and the drug metabolizing enzyme CYP3A4** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2013.

WANG, Z.; THURMOND, D. C. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - Roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 7, p. 893–903, 2009.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, 2007.

WL, D. **The PyMOL Molecular Graphics System** *Schrödinger LLC*, 2002.

WU, J. et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 191–196, 2016.

WU, W.; ZHANG, X.; ZANELLO, L. P. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ antiproliferative actions involve vitamin D receptor-mediated activation of MAPK pathways and AP-1/p21waf1 upregulation in human osteosarcoma. **Cancer Letters**, 2007.

WU, X. et al. Association of serum calcium and insulin resistance with hypertension risk: A prospective population-based study. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2019.

XU, Q. A. et al. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on macrophage cytokine secretion stimulated by *Porphyromonas gingivalis*. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 2016.

XU, Y. et al. CavityPlus: A web server for protein cavity detection with pharmacophore

modelling, allosteric site identification and covalent ligand binding ability prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W374–W379, 2018.

XUAN, Y.; ZHAO, H. Y.; LIU, J. M. **Vitamin D and Type 2 diabetes mellitus** **Journal of Diabetes**, 2013.

YAMAMOTO, E. et al. Increased expression of ERp57/GRP58 is protective against pancreatic beta cell death caused by autophagic failure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 1, p. 19–24, 2014.

YANG, W. S. et al. Diosgenin, an Activator of 1,25D₃-MARRS Receptor/ERp57, Attenuates the Effects of TNF- α by Causing ADAM10-Dependent Ectodomain Shedding of TNF Receptor 1. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 2434–2445, 2017.

ZALK, R. et al. Structure of a mammalian ryanodine receptor. **Nature**, v. 517, n. 7532, p. 44–49, 2015.

ZAMONER, A. et al. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on ⁴⁵Ca²⁺ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 1, p. 98–103, 2007.

ZANATTA, A. P. et al. New ionic targets of 3,3',5'-triiodothyronine at the plasma membrane of rat Sertoli cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1861, n. 4, p. 748–759, 2019.

ZANATTA, L. et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ mechanism of action: Modulation of L-type calcium channels leading to calcium uptake and intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of young rats. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 10, p. 1708–1719, 2012.

ZENG, X. et al. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on pathological changes in rats with diabetic cardiomyopathy. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2017.

ZMIJEWSKI, M. A.; CARLBERG, C. Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes? **Experimental Dermatology**, v. 29, n. 9, p. 876–884, 2020.