ANA CLÁUDIA MUNHOZ

PARTICIPAÇÃO DA NADPH OXIDASE NO PROCESSO DE SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATAS ALIMENTADAS OU EM JEJUM.

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título De Mestre Em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Versão original

São Paulo

2014

RESUMO

MUNHOZ, A. C. **Participação da NADPH oxidase no processo de secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratas alimentadas ou em jejum.** 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Dentre os diversos fatores que influenciam a secreção de insulina, podemos destacar a NADPH oxidase, um complexo enzimático inicialmente identificado em fagócitos e que produz superóxido (O_2^-), uma espécie reativa de oxigênio (ERO), tendo como substrato o NADPH. As células β expressam algumas isoformas da NADPH oxidase, sendo a isoforma NOX2 a mais estudada até o momento. No presente estudo buscamos avaliar a importância da NOX2 na produção de EROs em ilhotas pancreáticas, isoladas de ratas Wistar, durante o processo de secreção de insulina induzido pela glicose (GSIS). Os animais alimentados ou em jejum de 24 e 48 horas foram eutanasiados e, após extração das ilhotas, as mesmas foram incubadas na presença de baixa (2,8 mM) ou alta (16,7 mM) concentração de glicose, associada ou não ao aminoácido leucina, com ou sem inibição farmacológica da NOX2. As ilhotas dos animais alimentados ou em jejum de 48 horas apresentaram reduzida secreção de insulina e altas concentrações de EROs quando incubadas na presença de 2,8 mM de glicose. Esses parâmetros foram invertidos pela adição de inibidores farmacológicos da NADPH oxidase (VAS2870 e DPI), uma vez que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado a partir do O_2^- reduz o metabolismo da glicose e dessa forma prejudica a GSIS, dando origem a uma correlação negativa entre os parâmetros avaliados. A leucina, que é metabolizada no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA), também aumentou a secreção de insulina, neste caso por aumento da relação ATP/ADP, e diminuiu o conteúdo das EROs. A diminuição do conteúdo das EROs ocorreu, possivelmente, devido ao metabolismo da leucina que produz substratos do TCA, e isso leva a produção de NADPH por diferentes vias, e também devido ao desvio do metabolismo da glicose para a via das pentose fosfato (PPP) causado pela inibição das enzimas fosfofrutoquinase e piruvato desidrogenase (PDH), após o acúmulo de, respectivamente, citrato e acetil-CoA durante a metabolização da leucina no TCA. A maior atividade da PPP aumenta a oferta de NADPH para os sistemas antioxidantes. Assim, fica clara a importância da NADPH oxidase e dos sistemas antioxidantes na manutenção do equilíbrio do estado redox das células β, gerindo o processo secretório de insulina de acordo com a maior ou menor metabolização da glicose. Desse modo, quando as ilhotas são submetidas a baixas concentrações de glicose ou ao jejum, a diminuição da atividade secretória das ilhotas é de fundamental importância para impedir que quantidades maiores de hormônios sejam secretadas, podendo levar a uma hipoglicemia mais acentuada incompatível com o funcionamento normal do organismo. Porém, na presença de alta concentração de glicose, a ativação das defesas antioxidantes da célula β são suficientes para atenuar o excesso de EROs produzido e dessa forma liberar a GSIS.

Palavras-chave: NADPH oxidase. Jejum. Espécies reativas de oxigênio. Secreção de insulina.

ABSTRACT

MUNHOZ, A. C. **NADPH oxidase participation in insulin secretion in pancreatic islets of fed or fasted rats.** 2014. 90 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Among several factors that influence insulin secretion, we can highlight the NADPH oxidase, an enzyme complex first identified in phagocytes and produces superoxide (O_2^-), a reactive oxygen specie (ROS), using NADPH as substrate. The pancreatic β cells express some isoforms of NADPH oxidase and NOX2 isoform is the most studied. In the present study we sought to evaluate the importance of NOX2 in ROS production in isolated pancreatic islets, from Wistar rats, during Glucose-Stimulated Insulin Secretion (GSIS). The fed animals or fasted for 24 and 48 hours animals were euthanized, and after extraction of the islets, they were incubated in the presence of low (2.8 mM) or high (16.7 mM) glucose levels, associated or not with leucine with or without pharmacological inhibition of NOX2. Islets of fed or 48 hours fasted animals showed reduced insulin secretion and high ROS levels when incubated in the presence of 2.8 mM glucose. These parameters were reversed by addition of pharmacological inhibitors of NADPH oxidase (VAS2870 and DPI), since hydrogen peroxide (H_2O_2) formed from O_2^- reduces glucose metabolism and thus impairs GSIS, presenting to a negative correlation between the parameters evaluated. Leucine, that is metabolized in Tricarboxylic Cycle Acids (TCA), also increased insulin secretion, in this case by increasing ATP/ADP ratio and decreased content of ROS. The decrease of the content of ROS occurred, possibly due to leucine metabolism, producing TCA substrates, and this leads to NADPH production by different routes, and also due to the diversion of glucose metabolism to Pentose Phosphate Pathway (PPP) caused by inhibition of phosphofructokinase and pyruvate dehydrogenase (PDH) enzymes after the accumulation of, respectively, citrate and acetyl-CoA during the metabolism of leucine in TCA. The highest activity of PPP increases the supply of NADPH for antioxidant systems. Thus, it is clear the importance of NADPH oxidase and antioxidant systems in maintaining the balance of the redox state of β cells, managing the insulin secretory process according to the higher or lower glucose metabolism. Thus, when the islets are subjected to low glucose levels or fasting, decreased secretory activity of the islets is crucial to prevent larger quantities of hormones from being secreted, which may lead to a more pronounced hypoglycemia incompatible with the normal operation of organism. However, in the presence of high glucose levels, activation of antioxidant defenses of the β cell are sufficient to mitigate the excess ROS produced and thus release the GSIS.

Keywords: NADPH oxidase. Fasting. Reactive oxygen specie. Insulin secretion.

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma doença crônica caracterizada por alteração da capacidade do organismo de controlar a homeostase da glicose sanguínea (RAINS; JAIN, 2011), cujos sintomas incluem hiperglicemia, poliúria, polidipsia, glicosúria, polifagia, entre outras. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas sejam portadoras de diabetes e que este número deve dobrar entre 2005 e 2030 (WILD et al., 2004). A elevação dos casos de diabetes está relacionada com o aumento das taxas de sobrepeso e obesidade associadas ao estilo de vida sedentário e também ao envelhecimento populacional, visto que a OMS relatou que 80% das pessoas com diabetes têm entre 35 e 64 anos de idade (GUPTA; KRUEGER; LASTRA, 2012; HU et al., 2001; HU; VAN DAM; LIU, 2001; WILD et al., 2004). A deficiência na produção e/ou ação da insulina são as causas fundamentais do diabetes mellitus, que ocasiona efeitos deletérios em diversos órgãos e sistemas.

A porção endócrina do pâncreas é denominada ilhota pancreática, e possui quatro tipos celulares: células α (secretoras de glucagon), células β (secretoras de insulina), células δ (secretoras de somatostatina) e células PP (secretoras de polipeptídios pancreáticos). As células β pancreáticas predominam na população de células endócrinas correspondendo de 70 a 80% da massa das ilhotas do pâncreas humano adulto (GUEST et al., 1991). Elas são consideradas como sensores dos combustíveis celulares provenientes da dieta, como a glicose, os ácidos graxos e os aminoácidos (NEWSHOLME et al., 2014), sendo que esses nutrientes exercem seus efeitos na secreção de insulina através da ativação do metabolismo da célula β (JENSEN et al., 2008).

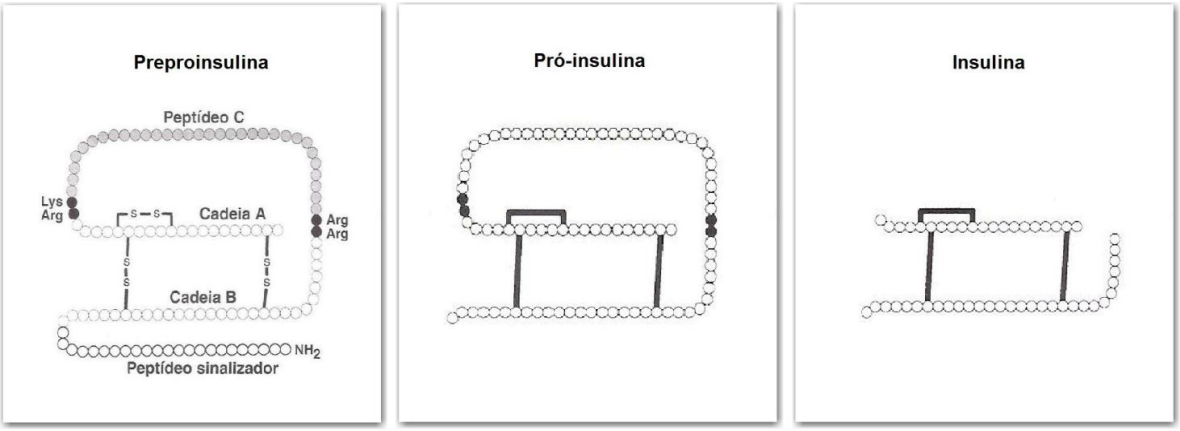
A insulina é um hormônio peptídico anabólico formado por duas cadeias de polipeptídios ligadas por duas pontes dissulfeto sendo sintetizada a partir de uma molécula precursora, a preproinsulina, sintetizada no retículo endoplasmático (figura 1), que é clivada e transformada em pró-insulina, a qual é convertida no hormônio funcional no complexo de Golgi onde são formados os grânulos secretórios (KAHN et al., 2009).

A insulina é armazenada no grânulo secretor maduro até ser liberada pelo processo de exocitose ou degradada pela crinofagia. O transporte direcional dos grânulos secretores para a membrana plasmática é realizado por meio da ação da estrutura citoesquelética de microcanalículos e microfilamentos (HOWELL, 1984; KELLY, 1990).

A insulina modula a homeostase da glicose, diminuindo sua produção hepática, aumentando sua captação pelos tecidos e reduzindo a utilização de substratos alternativos, principalmente nos tecidos muscular e adiposo (LE ROITH; ZICK, 2001).

A obesidade, o estado pró-inflamatório, a cronicidade da hiperglicemia (glicotoxicidade) e altas concentrações de lipídios circulantes (lipotoxicidade), estão relacionadas com a disfunção da célula β que levam à deficiência da produção e/ou secreção de insulina. (PRENTKI; NOLAN, 2006; REAVEN, 2006).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da preproinsulina, pró-insulina e insulina.



O precursor inicial da insulina, de alto peso molecular, consiste em quatro domínios distintos: peptídeo C, cadeia A, cadeia B e peptídeo sinalizador. O peptídeo sinalizador ocupa os primeiros 24 resíduos e é clivado dentro do retículo endoplasmático rugoso para produzir a pró-insulina. A conversão da pró-insulina em insulina ocorre por meio do corte endoproteolítico do peptídeo C. As duas cadeias de insulina (A e B) se unem por meio de duas pontes dissulfeto. Adaptado de Kahn et al., 2009.

1.1 Secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS)

Sob condições fisiológicas, a concentração de glicose no sangue varia dentro de uma faixa estreita, apesar da alternância entre os períodos de ingestão alimentar e jejum. Essa estabilidade é devido a um sistema hormonal notavelmente eficiente, que exerce efeitos opostos sobre os órgãos de armazenamento e produção de glicose. Embora diversos hormônios possam impedir declínios exagerados da glicemia, estimulando a glicogenólise e a gliconeogênese, insulina é o único hormônio que o organismo dispõe para reduzir a concentração de glicose no sangue, e por isso, a secreção de insulina está sujeita a um controle rígido de produção, armazenagem e liberação. Esse controle é assegurado principalmente pela concentração plasmática de glicose e por um conjunto de fatores metabólicos, neurais e hormonais (KAHN et al., 2009).

A secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS) se inicia com a entrada desse monossacarídeo na célula β pancreática através da ação de um transportador específico localizado na membrana plasmática, o GLUT2, presente em roedores e humanos

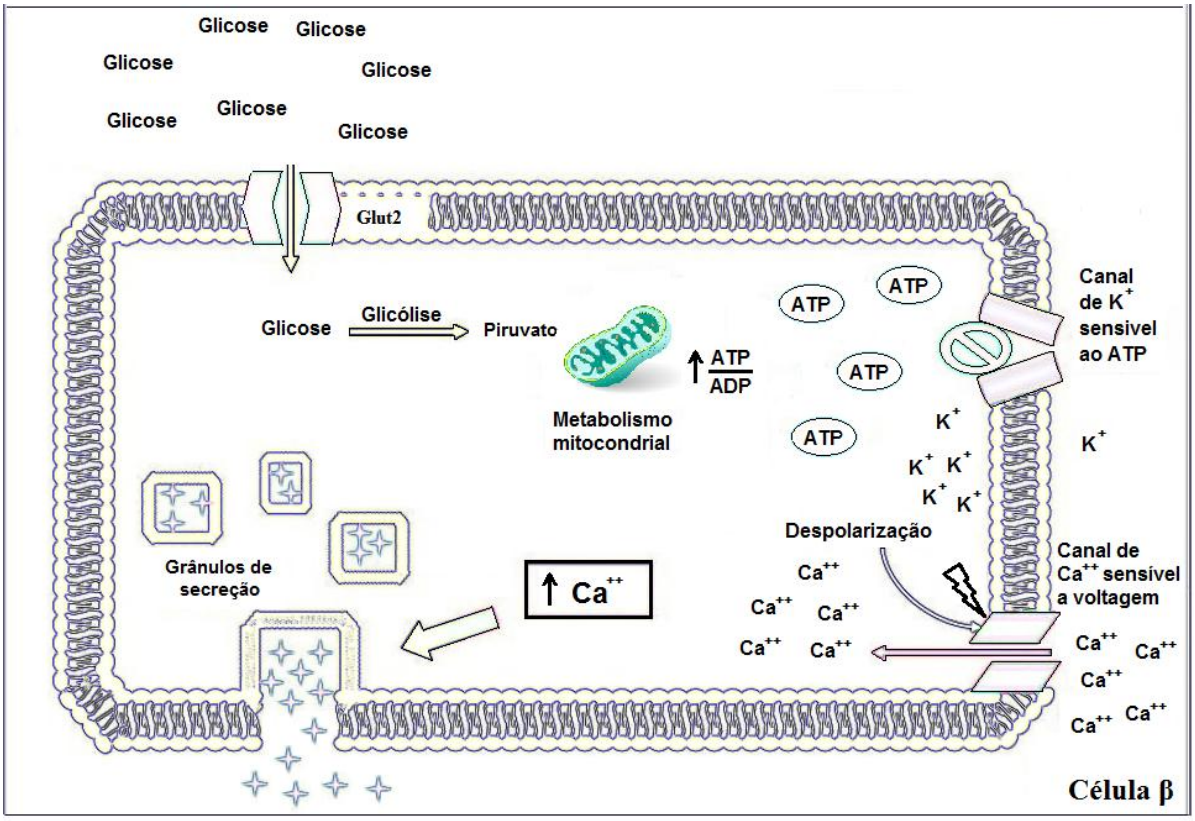
(NEWSHOLME et al., 2007). Segue-se a fosforilação da glicose pela enzima glicoquinase, dando origem à glicose-6-fosfato, que é metabolizada pela via glicolítica, gerando piruvato (figura 2). O piruvato, por sua vez, origina acetil-CoA que reage com oxalacetato, formando citrato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). No TCA são formados NADH e $FADH_2$, e esses co-fatores transferem elétrons para as proteínas da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, levando ao aumento da produção de ATP com consequente aumento da relação ATP/ADP (GEMBAL; GILON; HENQUIN, 1992).

O aumento dessa relação diminui a probabilidade de abertura dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), dificultando o efluxo desse íon, causando consequentemente, o acúmulo do mesmo no citosol e a despolarização da membrana plasmática. Essa despolarização aumenta a probabilidade de abertura dos canais para cálcio dependentes de voltagem, permitindo a entrada desse íon na célula β. O aumento do cálcio intracelular estimula a ancoragem e exocitose dos grânulos contendo insulina (GEMBAL; GILON; HENQUIN, 1992).

Esse processo desencadeante da secreção de insulina vem seguido de inúmeros eventos que amplificam e/ou mantém o processo secretório, tais como a ativação da calmodulina, fosfolipase C, adenilciclase, fosfolipase A_2 e seus produtos finais de fosforilação (ASHCROFT, 1980; GAGLIARDINO et al., 1980; HENQUIN, 2011; KONRAD et al., 1992; KRAUSZ et al., 1980; MEANS; DEDMAN, 1980; PACE, 1988; SCHUBART; ERLICHMAN; FLEISCHER, 1980; WOLLHEIM; BIDEN, 1986; WOLLHEIM; REGAZZI, 1990).

Os mecanismos que levam a disfunção da célula β pancreática presente no diabetes mellitus têm sido objetos de muitas investigações clínicas e experimentais. Recentemente, diversas evidências sugerem que o estresse oxidativo promove alterações na célula β pancreática, tanto em modelos animais com diabetes, quanto em pacientes diabéticos (BROWNLEE, 2003; RAINS; JAIN, 2011). O termo estresse oxidativo é utilizado para designar o desequilíbrio no balanço entre as defesas antioxidantes e os agentes oxidantes (radicais livres e espécies reativas não-radicalares) que podem levar à injúria tecidual.

Figura 2 – Resumo esquemático dos eventos que desencadeiam a secreção de insulina na célula β pancreática.

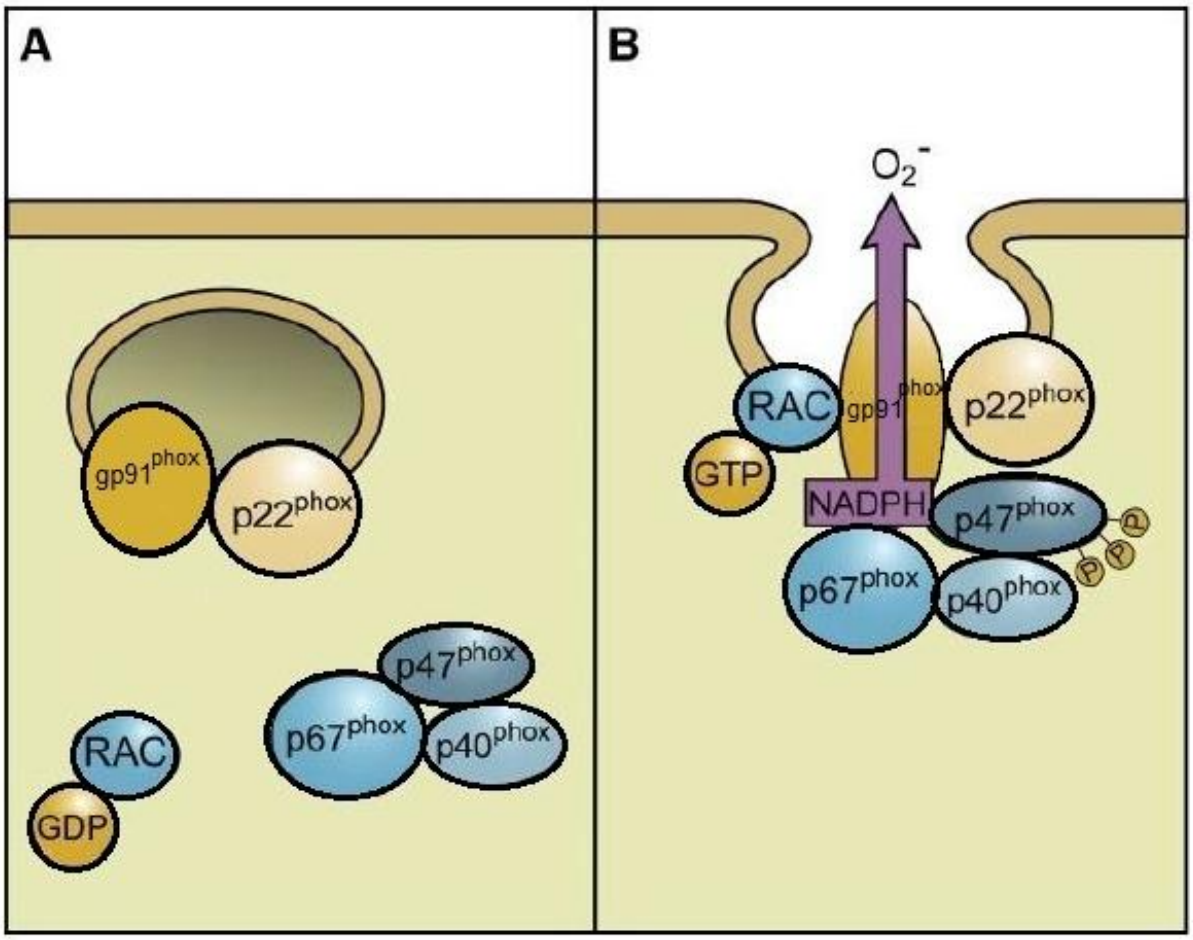


1.2 Estresse oxidativo e fontes de espécies reativas de oxigênio nas ilhotas pancreáticas

Os radicais livres podem ser definidos como espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo. Como os elétrons tendem ao pareamento, esta característica confere maior instabilidade e aumento da reatividade química, e, na busca por maior estabilidade, os radicais livres reagem com outras moléculas, doando (ação redutora) ou recebendo elétrons (ação oxidante).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são átomos ou moléculas de oxigênio quimicamente reativas formadas como um produto normal do metabolismo aeróbico (DEVASAGAYAM et al., 2004). As células podem produzir EROs através de diferentes processos bioquímicos, mas as principais fontes, na ilhota pancreática, são a mitocôndria (redução parcial do oxigênio molecular durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase.

Figura 3 – Esquema ilustrativo da NADPH oxidase.



Após ativação, há troca de GDP para GTP na Rac. A fosforilação da subunidade p47^{phox} leva a uma mudança conformacional permitindo a interação com a p22^{phox}. O movimento da p47^{phox} acarreta em acoplamento de outras subunidades citosólicas, a p67^{phox} e a p40^{phox}, formando o complexo ativado (3B). Adaptado de Bedard e Krause, 2007.

1.3 NADPH oxidase e secreção de insulina

Dentre os diversos fatores que influenciam a GSIS, podemos destacar a NADPH oxidase, um complexo enzimático que apresenta várias subunidades que, no estado não ativado estão fisicamente separadas (Figura 3A). Alguns componentes são citosólicos (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, proteína G de baixo peso molecular, Rac 1 ou Rac 2) e outros são ancorados na membrana (gp91^{phox} e p22^{phox}).

Esse complexo enzimático foi descoberto em fagócitos e é conhecido por produzir grandes quantidades de EROs em neutrófilos e monócitos, onde tem papel fundamental na atividade microbicida. Nas células fagocíticas, a proteína quinase C (PKC) ativa o complexo enzimático pela fosforilação das subunidades citosólicas p47^{phox}, p67^{phox} e/ou Rac. A

fosforilação da subunidade $p47^{phox}$ leva a uma mudança conformacional nessa molécula que permite sua interação com a subunidade $p22^{phox}$. A translocação da $p47^{phox}$ para a membrana plasmática promove a interação da subunidade $p67^{phox}$ com a $gp91^{phox}$, fazendo com que a $p40^{phox}$ se una ao complexo. Por fim, a Rac interage com a $gp91^{phox}$ e o complexo é ativado (Figura 3B) (BEDARD; KRAUSE, 2007; NAUSEEF, 2008).

Até o momento, são conhecidas sete isoformas da NOX, denominadas NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, e DUOX2, cada uma com distribuição tecidual e função específica (GEISZT et al., 2003; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). Os diferentes tipos celulares podem expressar mais de uma isoforma. As células β pancreáticas expressam as isoformas NOX1, NOX2, NOX4 (UCHIZONO et al., 2006), sendo a isoforma NOX2 a mais estudada até o momento (JIAO et al., 2012; MOHAMMED; KOWLURU, 2013; OLIVEIRA et al., 2003; REBELATO et al., 2012).

Entretanto, o papel desse complexo enzimático na fisiologia do processo secretório de insulina ainda não foi completamente esclarecido. Sabe-se que a NOX2 influencia a GSIS e participa da produção de EROs (Figura 4) nas ilhotas pancreáticas utilizando o NADPH como substrato para a transferência de um elétron para o oxigênio (BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002; BEDARD; KRAUSE, 2007; FU et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2003; REBELATO et al., 2012; VALLE et al., 2011).

A exposição aguda a altas concentrações de glicose era classicamente reportada como causadora de um aumento na concentração de EROs em ilhotas isoladas de ratos e em cultura de células tumorais INS-1(832/13) (LELOUP et al., 2009; PI et al., 2007; SYED; KYATHANAHALLI; KOWLURU, 2011). Porém, esses dados estão sendo revistos, pois um crescente número de evidências apontam que a resposta da célula β ao aumento da concentração de glicose é a diminuição da concentração das EROs, juntamente com o aumento da secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos (LACRAZ et al., 2009; MARTENS et al., 2005; REBELATO et al., 2011; VALLE et al., 2011).

1.4 Espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante da célula β

O superóxido (O_2^-) é uma espécie reativa de oxigênio que pode ser convertida a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela enzima superóxido dismutase (SOD), e o peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode ser transformado em oxigênio e água, principalmente pela catalase (CAT) e pela ação das glutationas. A glutationa peroxidase (GPx) converte o peróxido de hidrogênio em água, e nesse processo ela oxida a glutationa reduzida (GSH). A

glutationa oxidada formada (GSSH) é então reduzida de volta em GSH pela ação da glutationa redutase (GR), consumindo nesse processo o NADPH (Figura 4) (CIRCU; AW, 2008; CIRCU; AW, 2012; COELHO; SALVADOR; SAVAGEAU, 2010).

H_2O_2 é uma molécula estável, não carregada, livremente difusível que pode ser rapidamente sintetizada e destruída, em resposta a um estímulo externo (NEWSHOLME, et al., 2007). Células β pancreáticas são equipadas com moderada, mas fisiologicamente suficiente, capacidade de conversão de O_2^- em H_2O_2 no citoplasma pela CuZnSOD, cuja atividade aumenta com o aumento da GSIS (OLIVEIRA; CURI; CARPINELLI, 1999) e na mitocôndria, pela MnSOD (BRAND, 2010; LENAZ, 2001; MELOV et al., 1999). Mas, as concentrações das enzimas que transformam o H_2O_2 em água e oxigênio são baixas nas células β pancreáticas de ratos e em cultura de células RINm5f. Isso sugere que a célula β pode ser vulnerável ao acúmulo de H_2O_2 (TIEDGE et al., 1997).

EROs são produzidas e removidas constantemente, influenciando, dessa forma, o estado redox celular. Crescentes evidências indicam que EROs, em concentrações fisiológicas normais, estão envolvidas na sinalização da célula β e sua resposta aos secretagogos, consistindo em mais um meio de regulação da GSIS (BINDOKAS et al., 2003; FU et al., 2013; LELOUP et al., 2009; PI et al., 2007). Por outro lado, exposição crônica da célula β a altas concentrações de glicose tem se mostrado citotóxica devido à excessiva produção de EROs que pode, direta ou indiretamente, perturbar a integridade e as funções fisiológicas de moléculas como o DNA, proteínas ou lipídios, podendo levar a morte celular. Essas alterações contribuem para a instalação de patologias, entre as quais o diabetes mellitus está incluso (GOLDSTEIN et al., 2005; TIEDGE et al., 1997).

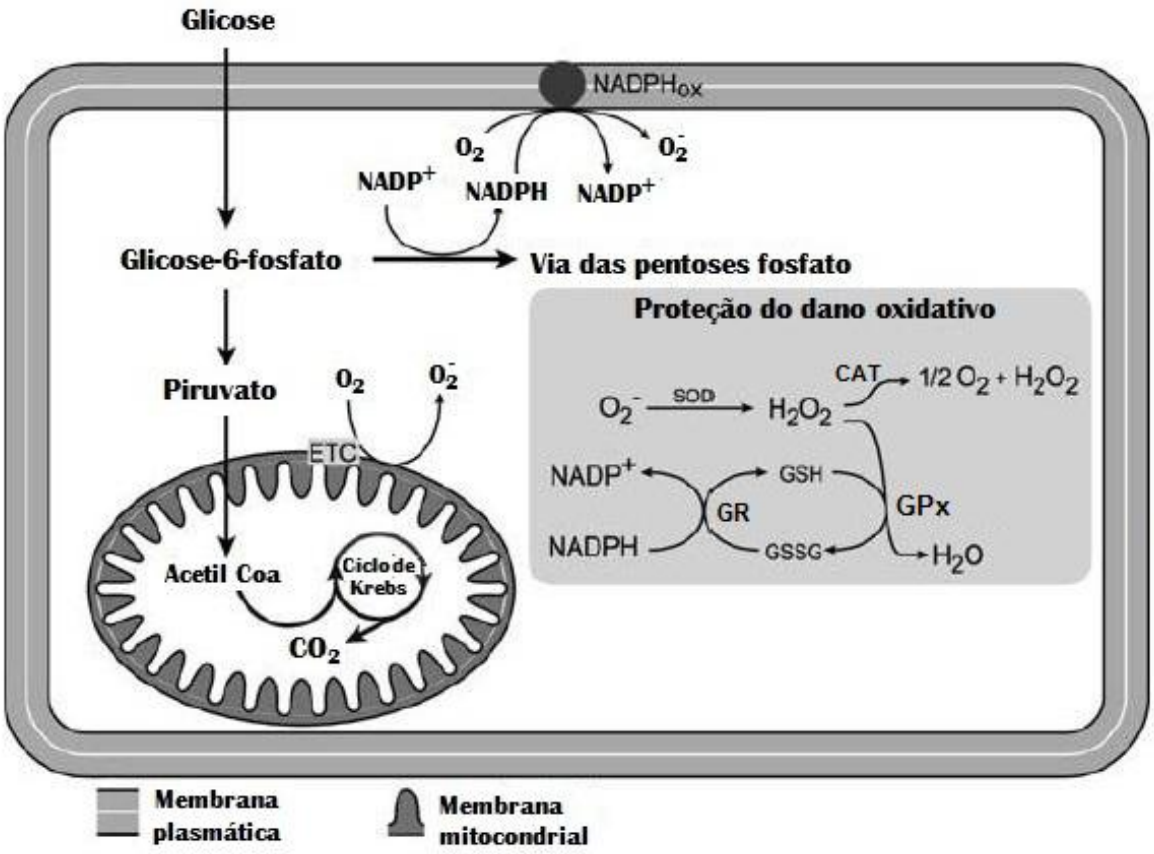
Nosso grupo tem mostrado que a formação de EROs durante o processo de secreção de insulina pode ser superada pela ativação de enzimas antioxidantes (OLIVEIRA; CURI; CARPINELLI, 1999; REBELATO et al., 2011) e provavelmente está relacionada com o aumento de NADPH, um importante substrato para as defesas antioxidantes (LACRAZ et al., 2009).

A atividade de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (via glicolítica) e aconitase (ciclo de Krebs), foi reportada como sendo inibida pela adição do H_2O_2 (BULTEAU; IKEDA-SAITO; SZWEDA, 2003; CHATHAM; GILBERT; RADDA, 1989). Dessa forma, o aumento do estado oxidativo pela adição de H_2O_2 prejudicou o metabolismo da glicose e a secreção de insulina (GIER et al., 2009; KRIPPEIT-DREWS et al., 1999; PI et al., 2007; REBELATO et al., 2010). O controle do conteúdo de H_2O_2 pela glicose nas células β pancreáticas parece ser importante para a

manutenção das funções celulares, sendo que aumentos no estado oxidativo e diminuições nas defesas antioxidantes parecem contribuir para diminuição da sensibilidade a insulina pelos tecidos e para uma resposta secretória a insulina comprometida (Kocić *et al.*, 2007).

Uma possível via pela qual a célula exerce esse controle seria por meio da ativação, pela glicose, da via das pentoses fosfato (PPP), onde o $NADP^+$ é consumido e o NADPH é produzido para ser utilizado como substrato para as defesas antioxidantes (Figura 4) (LACRAZ et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

Figura 4 – Relevantes fontes de produção de espécies reativas de oxigênio e sistemas antioxidantes celulares.



EROs podem ser geradas a partir do metabolismo da glicose na mitocôndria, pela atividade da cadeia transportadora de elétrons, e no citosol a partir da atividade da NADPH oxidase. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a glutationa peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Adaptado de Newsholme et al., 2007.

Rebelato e colaboradores mostraram que a inibição da PPP por deidroepiandrosterona (DHEA), um inibidor da glicose-6-fosfato desidrogenase, a enzima limitante dessa via, causa aumento do conteúdo de EROs, na presença de alta concentração de glicose (16,7 mM), para valores semelhantes àqueles observados na presença de baixa concentração de glicose (2,8 mM), sugerindo um prejuízo da homeostase de EROs pela célula β pancreática. Esse efeito causou drástica diminuição da secreção de insulina. Isso foi revertido com a adição de antioxidantes como a N-acteil-L-cisteína (NAC) e a catalase na sua forma permeável de membrana (PEG-CAT), que preveniram o aumento de EROs causado pelo bloqueio da PPP (REBELATO et al., 2011).

Esses resultados sugerem que a ativação da PPP modula o conteúdo das EROs que, em altas concentrações, exerce um efeito inibitório no metabolismo da glicose. Assim, o controle do conteúdo de EROs durante a metabolização da glicose pode ser considerado como parte do processo de secreção de insulina estimulada pela glicose.

1.5 Espécies reativas de oxigênio e o jejum

Vários parâmetros fisiológicos e bioquímicos no pâncreas endócrino são alterados durante o jejum, como a secreção de insulina, o metabolismo da ilhota pancreática, a sensibilidade e a resposta secretora das células β à glicose, embora o conteúdo de insulina das células β esteja preservado (BLÁZQUEZ; QUIJADA, 1968; BOSBOOM; ZWEENS; BOUMAN, 1973; MALAISSE; MALAISSE-LAGAE; WRIGHT, 1967).

A secreção de insulina e a utilização da glicose, avaliadas em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos alimentados ou submetidos ao jejum de 48 horas, mostraram que no estado alimentado a secreção de insulina aumentou seis vezes quando a concentração de glicose extracelular foi alterada de 2,5 mM para 16,7 mM. Porém, a resposta secretória a glicose das ilhotas isoladas dos ratos em jejum se apresentou diminuída em todas as concentrações de glicose (HEDESKOV; CAPITO, 1974). Svenningsen e Bonnevie-Nielsen mostraram que a secreção de insulina por ilhotas isoladas de ratos diminuiu em 60% e 76% após exposição de 24 horas e 48 horas de jejum, respectivamente (Svenningsen e Bonnevie-Nielsen, 1984).

Sabendo que a produção de EROs nas células β é maior na presença de baixas concentrações de glicose e que, nessas concentrações, a secreção de insulina é menor, e tendo em vista a importância da NADPH oxidase na produção de EROs, é plausível sugerir que ela participe mais ativamente do processo secretório de insulina na presença de baixas concentrações de glicose agindo como um inibidor da secreção do hormônio. Essa ação seria

importante para a homeostase glicêmica, visto que, durante o jejum, a secreção elevada de insulina seria prejudicial podendo levar a hipoglicemia. Assim, no presente trabalho buscamos estudar o comportamento da NADPH oxidase e a produção de EROs em ratos alimentados e em jejum de 24 e 48 horas e a relação dessa produção com a secreção de insulina.

2 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que a produção de superóxido pela NADPH oxidase é importante para manter diminuída a secreção de insulina pelas células β pancreáticas na presença de baixas concentrações desse monossacarídeo (2,8 mM ou no jejum). Porém, na presença de alta concentração de glicose a ativação das defesas antioxidantes da célula β supera a produção de EROs e a secreção de insulina liberada.

Os dados apoiam também a hipótese de que a ativação da PPP e do TCA modulam o conteúdo de EROs fornecendo NADPH para os sistemas antioxidantes. Considerando que a alta concentração de EROs exerce efeito inibitório no metabolismo da glicose e na secreção da insulina, o controle do estado redox durante a metabolização da glicose pode ser considerado como parte dos mecanismos envolvidos no processo de secreção de insulina estimulada pela glicose e tanto a NADPH oxidase como os sistemas antioxidantes tem participação ativa nesse processo.

REFERÊNCIAS[1]

ASHCROFT, S. J. Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. **Diabetologia,** v. 18, n. 1, p. 5-15, Jan 1980.

BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Arch Biochem. Biophys.,** v. 397, n. 2, p. 342-344, Jan 2002.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol. Rev.,** v. 87, n. 1, p. 245-313, Jan 2007.

BINDOKAS, V. P. et al. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. **J. Biol. Chem.,** v. 278, n. 11, p. 9796-9801, Mar 2003.

BLÁZQUEZ, E.; QUIJADA, C. L. The effect of a high-fat diet on glucose, insulin sensitivity and plasma insulin in rats. **J. Endocrinol.,** v. 42, n. 4, p. 489-494, Dec 1968.

BOSBOOM, R. S.; ZWEENS, J.; BOUMAN, P. R. Effects of feeding and fasting on the insulin secretory response to glucose and sulfonylureas in intact rats and isolated perfused rat pancreas. **Diabetologia,** v. 9, n. 4, p. 243-250, Aug 1973.

BRAND, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. **Exp. Gerontol.,** v. 45, n. 7-8, p. 466-472, Aug 2010.

BROWNLEE, M. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. **J. Clin. Invest.,** v. 112, n. 12, p. 1788-1790, Dec 2003.

BULTEAU, A. L.; IKEDA-SAITO, M.; SZWEDA, L. I. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. **Biochemistry,** v. 42, n. 50, p. 14846-14855, Dec 2003.

CHATHAM, J. C.; GILBERT, H. F.; RADDA, G. K. The metabolic consequences of hydroperoxide perfusion on the isolated rat heart. **Eur. J. Biochem.,** v. 184, n. 3, p. 657-662, Oct 1989.

[1] De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Glutathione and apoptosis. **Free Radic. Res.,** v. 42, n. 8, p. 689-706, Aug 2008.

_____. Glutathione and modulation of cell apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta.,** v. 1823, n. 10, p. 1767-1777, Oct 2012.

COELHO, P. M.; SALVADOR, A.; SAVAGEAU, M. A. Relating mutant genotype to phenotype via quantitative behavior of the NADPH redox cycle in human erythrocytes. **PLoS. One,** v. 5, n. 9, 2010.

DEVASAGAYAM, T. P. et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **J. Assoc. Physicians. India,** v. 52, p. 794-804, Oct 2004.

FU, J. et al. Divergent Effects of Sulforaphane on Basal and Glucose-Stimulated Insulin Secretion in β-Cells: Role of Reactive Oxygen Species and Induction of Endogenous Antioxidants. **Pharm. Res.,** v. 30, n. 9, p. 2248-2259, Sep 2013.

GAGLIARDINO, J. J. et al. Evidence for the participation of calmodulin in stimulus-secretion coupling in the pancreatic beta-cell. **Biochem. J.,** v. 192, n. 3, p. 919-927, Dec 1980.

GEISZT, M. et al. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. **J. Biol. Chem.,** v. 278, n. 22, p. 20006-20012, May 2003.

GEMBAL, M.; GILON, P.; HENQUIN, J. C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K+ channels in mouse B cells. **J. Clin. Invest.,** v. 89, n. 4, p. 1288-1295, Apr 1992.

GIER, B. et al. Suppression of KATP channel activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress. **J. Clin. Invest.,** v. 119, n. 11, p. 3246-3256, Nov 2009.

GOLDSTEIN, B. J. et al. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. **Diabetes,** v. 54, n. 2, p. 311-321, Feb 2005.

GUEST, P. C. et al. Insulin secretory granule biogenesis. Co-ordinate regulation of the biosynthesis of the majority of constituent proteins. **Biochem. J.,** v. 274 (Pt 1), p. 73-78, Feb 1991.

GUPTA, D.; KRUEGER, C. B.; LASTRA, G. Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of β-cell dysfunction. **Curr. Diabetes Rev.,** v. 8, n. 2, p. 76-83, Mar 2012.

HEDESKOV, C. J.; CAPITO, K. The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets. **Biochem. J.,** v. 140, n. 3, p. 423-433, Jun 1974.

HENQUIN, J. C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β-cells. **Diabetes Res. Clin. Pract.,** v. 93 Suppl 1, p. 27-31, Aug 2011.

HOWELL, S. L. The mechanism of insulin secretion. **Diabetologia,** v. 26, n. 5, p. 319-327, May 1984.

HU, F. B. et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. **N. Engl. J. Med.,** v. 345, n. 11, p. 790-797, Sep 2001.

HU, F. B.; VAN DAM, R. M.; LIU, S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. **Diabetologia,** v. 44, n. 7, p. 805-817, Jul 2001.

JENSEN, M. V. et al. Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.,** v. 295, n. 6, p. 1287-1297, Dec 2008.

JIAO, J. et al. NADPH oxidase 2 plays a critical role in dysfunction and apoptosis of pancreatic β-cells induced by very low-density lipoprotein. **Mol. Cell. Biochem.,** v. 370, n. 1-2, p. 103-113, Nov 2012.

KAHN, C. R. et al. **Joslin: Diabetes Melito**. 14. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KOCIĆ, R. et al. Susceptibility to oxidative stress, insulin resistance, and insulin secretory response in the development of diabetes from obesity. **Vojnosanit. Pregl.,** v. 64, n. 6, p. 391-397, Jun 2007.

KONRAD, R. J. et al. Inhibition of phospholipase A2 and insulin secretion in pancreatic islets. **Biochim. Biophys. Acta.,** v. 1135, n. 2, p. 215-220, Jun 1992.

KRAUSZ, Y. et al. Possible role for calmodulin in insulin release. Studies with trifluoperazine in rat pancreatic islets. **J. Clin. Invest.,** v. 66, n. 3, p. 603-607, Sep 1980.

KRIPPEIT-DREWS, P. et al. Interference of H2O2 with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. **J. Physiol.,** v. 514 (Pt 2), p. 471-481, Jan 1999.

LACRAZ, G. et al. Diabetic beta-cells can achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses. **PLoS. One,** v. 4, n. 8, p. 6500, 2009.

LE ROITH, D.; ZICK, Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. **Diabetes Care,** v. 24, n. 3, p. 588-597, Mar 2001.

LELOUP, C. et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. **Diabetes,** v. 58, n. 3, p. 673-681, Mar 2009.

LENAZ, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. **IUBMB. Life,** v. 52, n. 3-5, p. 159-164, 2001 Sep-Nov 2001.

MALAISSE, W. J.; MALAISSE-LAGAE, F.; WRIGHT, P. H. Effect of fasting upon insulin secretion in the rat. **Am. J. Physiol.,** v. 213, n. 4, p. 843-848, Oct 1967.

MARTENS, G. A. et al. Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells. **J. Biol. Chem.,** v. 280, n. 21, p. 20389-20396, May 2005.

MEANS, A. R.; DEDMAN, J. R. Calmodulin in endocrine cells and its multiple roles in hormone action. **Mol. Cell. Endocrinol.,** v. 19, n. 3, p. 215-227, Sep 1980.

MELOV, S. et al. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 96, n. 3, p. 846-851, Feb 1999.

MOHAMMED, A. M.; KOWLURU, A. Activation of apocynin-sensitive NADPH oxidase (Nox2) activity in INS-1 832/13 cells under glucotoxic conditions. **Islets,** v. 5, n. 3, May 2013.

NAUSEEF, W. M. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. **J. Biol. Chem.,** v. 283, n. 25, p. 16961-16965, Jun 2008.

NEWSHOLME, P. et al. Nutrient regulation of insulin secretion and action. **J. Endocrinol.**, Mar 2014.

_____. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **J. Physiol.,** v. 583, n. Pt 1, p. 9-24, Aug 2007.

_____. Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. **Clin. Sci. (Lond),** v. 112, n. 1, p. 27-42, Jan 2007.

OLIVEIRA, H. R.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. **Am. J. Physiol.,** v. 276, n. 2 Pt 1, p. 507-510, Feb 1999.

OLIVEIRA, H. R. et al. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. **Diabetes,** v. 52, n. 6, p. 1457-1463, Jun 2003.

PI, J. et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. **Diabetes,** v. 56, n. 7, p. 1783-1791, Jul 2007.

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. **J. Clin. Invest.,** v. 116, n. 7, p. 1802-1812, Jul 2006.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic. Biol. Med.,** v. 50, n. 5, p. 567-575, Mar 2011.

REAVEN, G. M. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? **Am. J. Clin. Nutr.,** v. 83, n. 6, p. 1237-1247, Jun 2006.

REBELATO, E. et al. Low doses of hydrogen peroxide impair glucose-stimulated insulin secretion via inhibition of glucose metabolism and intracellular calcium oscillations. **Metabolism,** v. 59, n. 3, p. 409-413, Mar 2010.

_____. Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism. **PLoS. One,** v. 6, n. 8, p. 24507, 2011.

_____. Expression of NADPH oxidase in human pancreatic islets. **Life Sci.,** v. 91, n. 7-8, p. 244-9, Sep 2012.

SCHUBART, U. K.; ERLICHMAN, J.; FLEISCHER, N. The role of calmodulin in the regulation of protein phosphorylation and insulin release in hamster insulinoma cells. **J. Biol. Chem.,** v. 255, n. 9, p. 4120-4124, May 1980.

SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 338, n. 1, p. 677-686, Dec 2005.

SVENNINGSEN, A.; BONNEVIE-NIELSEN, V. Effects of fasting on beta-cell function, body fat, islet volume, and total pancreatic insulin content. **Metabolism,** v. 33, n. 7, p. 612-616, Jul 1984.

SYED, I.; KYATHANAHALLI, C. N.; KOWLURU, A. Phagocyte-like NADPH oxidase generates ROS in INS 832/13 cells and rat islets: role of protein prenylation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 300, n. 3, p. 756-762, Mar 2011.

TIEDGE, M. et al. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes,** v. 46, n. 11, p. 1733-1742, Nov 1997.

UCHIZONO, Y. et al. Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. **Life Sci.,** v. 80, n. 2, p. 133-139, Dec 2006.

VALLE, M. M. et al. Alterations of NADPH oxidase activity in rat pancreatic islets induced by a high-fat diet. **Pancreas,** v. 40, n. 3, p. 390-395, Apr 2011.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care,** v. 27, n. 5, p. 1047-1053, May 2004.

WOLLHEIM, C. B.; BIDEN, T. J. Signal transduction in insulin secretion: comparison between fuel stimuli and receptor agonists. **Ann. NY. Acad. Sci.,** v. 488, p. 317-333, 1986.

WOLLHEIM, C. B.; REGAZZI, R. Protein kinase C in insulin releasing cells. Putative role in stimulus secretion coupling. **FEBS. Lett.,** v. 268, n. 2, p. 376-380, Aug 1990.

ZHANG, Z. et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. **FASEB. J.,** v. 24, n. 5, p. 1497-1505, May 2010.