ELOISA APARECIDA VILAS BOAS

**TRATAMENTO CRÔNICO COM ÁCIDO PALMÍTICO AUMENTA O
CONTEÚDO DE SUPERÓXIDO E A APOPTOSE DE CÉLULAS
BRIN-BD11 COM PARTICIPAÇÃO DA NADPH OXIDASE, SEM
ENVOLVIMENTO DO GPR40**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

ELOISA APARECIDA VILAS BOAS

**TRATAMENTO CRÔNICO COM ÁCIDO PALMÍTICO AUMENTA O
CONTEÚDO DE SUPERÓXIDO E A APOPTOSE DE CÉLULAS
BRIN-BD11 COM PARTICIPAÇÃO DA NADPH OXIDASE, SEM
ENVOLVIMENTO DO GPR40**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 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
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vilas-Boas, Eloisa Aparecida.

Tratamento crônico com ácido palmítico aumenta o conteúdo de superóxido e a apoptose de células BRIN-BD11 com participação da NADPH oxidase, sem envolvimento do GPR40 / Eloisa Aparecida Vilas-Boas. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia da secreção de insulina.

Versão do título para o inglês: Chronic treatment with palmitic acid increases superoxide content and apoptosis of BRIN-BD11 cells with participation of NADPH oxidase, without GPR40 involvement.

1. Ácido palmítico 2. Lipotoxicidade 3. GPR40 4. NADPH oxidase
5. Estresse de retículo I. Carpinelli, Prof. Dr. Angelo Rafael
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0119/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eloisa Aparecida Vilas-Boas.

Título da Dissertação: Tratamento crônico com ácido palmítico aumenta o conteúdo de superóxido e a apoptose de células BRIN-BD11 com participação da NADPH oxidase, sem envolvimento do GPR40.

Orientador(a): Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 445/11 referente ao projeto intitulado: *“Efeitos agudos e crônicos dos ácidos oléico e palmítico e do agonista GW9508 na secreção de insulina e no estresse oxidativo da linhagem BRIN-BD11”* sob a responsabilidade de Eloisa Aparecida Vilas Boas, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 11 de março de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **074** nas fls. **130** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Angelo Rafael Carpinelli**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Efeitos agudos e crônicos dos ácidos oléico e palmítico e do agonista GW9508 na secreção de insulina e no estresse oxidativo de células secretoras de insulina"* do qual participam o(s) aluno(s) **Eloísa Aparecida Vilas Bôas, Letícia Prates Roma**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **01.08.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 10 de agosto de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, José e Josefa, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, sempre com muito amor e palavras de sabedoria. Obrigada por absolutamente tudo!

Ao meu irmão, Eduardo, minha inspiração para estudar insulina.

Amo vocês!

*Ao meu noivo, Joel, meu grande parceiro
e companheiro amoroso, por estar sempre
presente nos melhores e piores
momentos.*

Seguimos juntos para uma nova etapa.

Te amo!

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar sabedoria e tranquilidade e mostrar a direção nos momentos mais difíceis.

Ao professor Angelo Carpinelli, por ter me aceitado e apostado em mim todos esses anos, desde a Iniciação Científica. Obrigada pelas conversas e ensinamentos!

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia da Secreção de Insulina por compartilharem as alegrias e angústias da pós-graduação. Em ordem alfabética: Ana (Aninha), Arnaldo (Arnold, meu consultor para assuntos de informática, sempre prestativo), Camila (Camilinha, somos muito capazes!), Daniel (Dandan), Daniela (Dani, que me adotou e me ensinou muito), Eduardo (Dudu), Fernanda (Fer, minha companheira de viagem e conselheira), Gabriela (Gabi), Katherine (Kathe, “tamo junto”), Laila, Letícia (Lelê, Lets), Maíra (hermanita e companheira de viagem) e Patrícia (Pati). Foi muito bom ter o apoio de vocês, principalmente nos momentos em que parecia que tudo ia dar errado! Obrigada por todas as risadas, pela rica troca de experiências, por toda ajuda e paciência. Sentirei muita saudade...

Um agradecimento especial à Gabi e Letícia, que colaboraram ativamente para o desenvolvimento do projeto e que, mais do que colaboradoras, se tornaram grandes amigas.

À Marlene (Má), pelo excelente suporte técnico e pela infinita paciência em comandar a creche!

Aos colegas de outros laboratórios Caio, Daniel e Hadassa, por todas as nossas conversas.

Obrigada ao prof. Fernando Abdulkader, prof. Rui Curi e profa. Carla por abrirem seus laboratórios e possibilitarem o uso de equipamentos. Obrigada à professora Emiko Hirata pelo carinho e pela troca de ideias.

Aos funcionários do Biotério de Criação e Biotério de Experimentação por cuidarem tão bem dos animais.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica e da secretaria do Programa, em especial ao Itamar, pela boa vontade em sempre ajudar com os computadores, e ao Zé Maria, pela paciência.

Um agradecimento especial ao Artur Keppler, meu primeiro co-orientador, por me ensinar meus primeiros passos na ciência!

À Verona (Vê), minha grande amiga e confidente, que mesmo de longe sempre esteve muito presente.

A todos os meus amigos queridos de graduação e CAFB pelo incentivo e torcida, especialmente Karina (Ká), Caio, Dani e Nina.

Mais uma vez obrigada aos meus pais, meus maiores exemplos de luta e persistência! Mesmo sem compreenderem bem o que eu fazia, sempre torceram por mim e me incentivaram em todos os momentos, sempre com muito amor. Obrigada pela compreensão nos momentos em que eu não pude estar presente.

Ao Joel, meu amor, o meu maior incentivador para fazer pós-graduação. Obrigada pela paciência e apoio em todos os momentos, meu querido!

À família Reis (Elio, Marinelva, Keila e Marina) por me receber sempre de braços abertos. Obrigada pela torcida e por todo o carinho!

À CAPES, CNPQ e FAPESP, pelo apoio financeiro. Principalmente à FAPESP, pela bolsa concedida.

Muito obrigada a todos que contribuíram para a minha formação!

RESUMO

Vilas-Boas EA. Tratamento crônico com ácido palmítico aumenta o conteúdo de superóxido e a apoptose de células BRIN-BD11 com participação da NADPH oxidase, sem envolvimento do GPR40 [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A exposição crônica a ácidos graxos (AGs), principalmente saturados, pode provocar disfunção da célula beta com redução da secreção de insulina e indução de apoptose, fenômeno conhecido como lipotoxicidade. O desenvolvimento de lipotoxicidade em células beta pancreáticas tem sido relacionado a diversos fatores, como: estresse de retículo endoplasmático (RE), estimulação crônica do receptor de ácidos graxos GPR40 e aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes, entre outras fontes, da enzima NADPH oxidase. Tais mecanismos não ocorrem isolados e podem estar interligados. Apesar das evidências existentes em outros tipos celulares, a relação entre NADPH oxidase e estresse de RE, levando à apoptose de células beta pancreáticas ainda requer maiores investigações. Dessa forma, pretendeu-se explorar como possíveis mecanismos de lipotoxicidade: o estresse de RE, a estimulação crônica do GPR40 e a geração de EROs pela enzima NADPH oxidase, bem como as possíveis relações entre NADPH oxidase e estresse de RE. Verificamos que cronicamente o ácido palmítico provocou aumento no conteúdo de superóxido e diminuição do conteúdo e secreção de insulina. Além disso, a enzima NADPH oxidase é importante, porém não é a única fonte de produção de superóxido após tratamento crônico com ácido palmítico. A inibição da NADPH oxidase com o inibidor farmacológico VAS2870 reverteu a apoptose provocada pela exposição crônica ao ácido palmítico e apresentou relação com uma menor expressão proteica de um dos marcadores do estresse de retículo (PERK). O GW9508, agonista do GPR40, não provocou os mesmos efeitos observados cronicamente com o ácido palmítico, sugerindo que a ativação da via do GPR40 não esteja envolvida nestes processos.

Palavras-chave: Ácido palmítico. Lipotoxicidade. GPR40. NADPH oxidase. Estresse de retículo.

ABSTRACT

Vilas-Boas EA. Tratamento crônico com ácido palmítico aumenta o conteúdo de superóxido e a apoptose de células BRIN-BD11 com participação da NADPH oxidase, sem envolvimento do GPR40 [dissertation (Masters thesis in Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Chronic exposure to fatty acids, particularly saturated fatty acids, can lead to beta cell dysfunction, reduction of insulin secretion and apoptosis induction, condition known as lipotoxicity. The development of lipotoxicity in pancreatic beta cells has been related to many conditions, such as: endoplasmic reticulum stress, chronic stimulation of GPR40 and increased production of reactive oxygen species (ROS) from, among other sources, the enzyme NADPH oxidase. Such mechanisms do not occur isolated and may be interconnected. Despite the existing evidence in other cellular types, a connection between NADPH oxidase and reticulum stress, leading to apoptosis in pancreatic beta cells still require further investigations. Thus, in this work we intended to explore as possible mechanisms of lipotoxicity: the reticulum stress, the chronic stimulation of GPR40 and the NADPH oxidase generation of ROS, as well as possible relations between NADPH oxidase and reticulum stress. Our results show that chronically palmitic acid induced an increase in the superoxide content and a decrease in the insulin content and secretion. Furthermore, the enzyme NADPH oxidase is important, but not the only source, for chronic palmitic acid induced superoxide formation. NADPH oxidase inhibition by the pharmacological inhibitor VAS2870 reverted the apoptosis induced by chronic exposure to palmitic acid, and was related to a lower expression of a reticulum stress marker (PERK). GW9508, GPR40 agonist, did not produced the same effects observed after chronic treatment with palmitic acid, suggesting that activation of GPR40 pathway is not involved in these processes.

Keywords: Palmitic acid. Lipotoxicity. GPR40. NADPH oxidase. Reticulum stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Vias envolvidas no estresse de retículo endoplasmático.....	27
Figura 2 -	Conteúdo de superóxido em diferentes períodos de tempo após incubação com ácido palmítico em 5,6 mM de glicose.....	42
Figura 3 -	Conteúdo de superóxido em diferentes períodos de tempo após incubação com ácido palmítico em 16,7 mM de glicose.....	43
Figura 4 -	Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870.....	44
Figura 5 -	Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de diferentes concentrações de apocinina.....	46
Figura 6 -	Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de diferentes concentrações de DPI.....	47
Figura 7 -	Porcentagem de células viáveis e não viáveis após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870.....	48
Figura 8 -	Porcentagem de células em apoptose após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870.....	48
Figura 9 -	Porcentagem de células mortas após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870.....	49
Figura 10 -	Expressão proteica de PERK fosforilado em relação a PERK total após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870.....	51
Figura 11 -	Expressão proteica de elf2 α fosforilado em relação a elf2 α total após	

48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870	52
Figura 12 - Expressão proteica de CHOP-10 após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870.....	53
Figura 13 - Conteúdo de superóxido após 1 hora de incubação com GW9508 em 5,6 mM ou 16,7 mM de glicose.....	54
Figura 14 - Conteúdo de superóxido em diferentes períodos de tempo após incubação com GW9508 em 5,6 mM de glicose.....	55
Figura 15 - Conteúdo de superóxido em diferentes períodos de tempo após incubação com GW9508 em 16,7 mM de glicose.....	56
Figura 16 - Conteúdo de superóxido após 24 horas de incubação com GW9508 em 5,6 ou 16,7 mM de glicose.....	57
Figura 17 - Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com GW9508 em 11,1 mM de glicose.....	57
Figura 18 - Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com GW9508 na presença ou ausência de VAS2870.....	59
Figura 19 - Porcentagem de células viáveis após 48 horas de incubação com GW9508 na ausência ou presença de VAS2870.....	60
Figura 20 - Porcentagem de células em apoptose após 48 horas de incubação com GW9508 na ausência ou presença de VAS2870.....	61
Figura 21 - Porcentagem de células mortas após 48 horas de incubação com GW9508 na ausência ou presença de VAS2870.....	61

Figura 22 - Secreção de insulina após 48 horas de incubação com ácido palmítico 5,6 ou 16,7 mM de glicose.....	63
Figura 23 - Conteúdo de insulina após 48 horas de incubação com ácido palmítico em 5,6 ou 16,7 mM de glicose.....	64
Figura 24 - Conteúdo de insulina após 48 horas de incubação com GW9508 em 5,6 ou 16,7 mM de glicose.....	66
Figura 25 - Secreção de insulina após 48 horas de incubação com GW9508 em 5,6 ou 16,7 mM de glicose.....	67
Figura 1A - Testes de concentração de DHE.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos utilizados para análise da expressão proteica.....	38
-------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – Adenosina difosfato

AG – Ácido graxo

ALAG – Albumina livre de ácidos graxos

ANOVA – Análise de variância

AP – Ácido palmítico

APO – Apocinina

ATF (ATF4 ou ATF6) – Fator de ativação da transcrição

ATP – Adenosina trifosfato

BRIN-BD11 – Fusão de linhagem RINm5F com ilhota pancreática de rato (*B Cell-RIN cell fusion*)

BiP – Proteína de ligação

CHOP – Proteína homóloga a C/EBP

CO₂ – Gás carbônico

CPT-I – Carnitina palmitoil transferase tipo I

DAG – Diacilglicerol

DHE – Dihidroetídeo

DM2 – *Diabetes mellitus* tipo 2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPI – Difenileneiodônio

DTT – Ditionitreitol

elf2 α – Fator eucariótico de iniciação 2 α

EPA – Ácido eicosapentaenoico

ERAD – Degradação associada ao retículo

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FADH₂ – Flavina adenina dinucleotídeo

GLUT – Transportador de glicose (transporte facilitado)

GPR (GPR40, GPR41, GPR43 ou GPR120) – Receptor de membrana acoplado à proteína G

GSIS – Secreção de insulina estimulada pela glicose

GW9508 – Fármaco agonista do GPR40

IP₃ – Inositol-1,4,5-trifosfato

IRE1 – Enzima que requer inositol 1

K_{ATP} – Canal de potássio sensível ao ATP

LC-CoA – Acil-CoA de cadeia longa

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

PBS – Solução salina de tampão fosfato

PERK – Quinase do retículo PKR-*like*

PIP₂ – Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC – Proteína quinase C

PLC – Fosfolipase C

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RE – Retículo endoplasmático

RINm5F – Linhagem obtida a partir de insulinoma de rato (*Rat Insulinoma*)

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

RE – Retículo endoplasmático

Rpm – Rotações por minute

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

UPR – Resposta da proteína mal dobrada

VAS2870 – Fármaco inibidor da NADPH oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Fontes de energia para a célula beta.....	22
1.1.1 Glicose.....	22
1.1.2 Ácidos graxos.....	23
1.2 Lipotoxicidade.....	25
1.3 Ácidos graxos e estresse de retículo endoplasmático.....	26
1.4 Estimulação crônica do GPR40.....	28
1.5 Espécies reativas de oxigênio.....	29
1.5.1 Enzima NADPH oxidase (estrutura e funcionalidade).....	29
1.5.2 Ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio.....	30
1.5.3 NADPH oxidase e estresse de retículo endoplasmático.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Cultura das células BRIN-BD11.....	34
4.2 Testes de meio de cultura.....	34
4.3 Determinação da concentração de DHE.....	34
4.4 Cultura das células BRIN-BD11 com ácido palmítico ou GW9508 e/ou inibidor da NADPH oxidase (VAS2870, apocinina ou DPI).....	35

4.5 Conteúdo de Superóxido de células BRIN-BD11.....	35
4.6 Apoptose de células BRIN-BD11.....	36
4.7 Estresse de retículo.....	37
4.8 Animais.....	38
4.9 Isolamento de ilhotas de Langerhans.....	38
4.10 Cultura de ilhotas.....	39
4.11 Secreção estática de insulina.....	39
4.12 Dosagem de insulina por radioimunoensaio.....	40
4.13 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com ácido palmítico por 1 hora, 24 horas ou 48 horas.....	42
5.2 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas.....	44
5.3 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de apocinina ou DPI por 48 horas.....	45
5.4 Avaliação da viabilidade celular após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas.....	47
5.5 Avaliação de marcadores do estresse de retículo endoplasmático após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas.....	50
5.6 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com GW9508 por 1 hora, 24 horas ou 48 horas.....	54
5.7 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas.....	59
5.8 Avaliação da apoptose após incubação com GW9508 na presença ou	

ausência de VAS2870 por 48 horas.....	59
5.9 Conteúdo e secreção de insulina após incubação com ácido palmítico por 48 horas.....	62
5.9.1 Secreção de insulina.....	63
5.9.2 Conteúdo de insulina.....	64
5.10 Conteúdo e secreção de insulina após incubação com GW9508 por 48 horas.....	65
5.10.1 Conteúdo de insulina.....	65
5.10.2 Secreção de insulina.....	67
6 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE A - Testes de diferentes meios de incubação.....	76
APÊNDICE B - Testes de concentração de DHE.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fontes de energia para a célula beta

1.1.1 Glicose

As células beta das ilhotas pancreáticas são responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de insulina. Esses processos são modulados, principalmente, pelas concentrações plasmáticas de glicose, principal combustível fisiológico da célula beta. A glicose presente no plasma entra rapidamente na célula beta através do transportador de glicose específico GLUT-2 e é, então, fosforilada pela enzima glicoquinase (primeira enzima da via glicolítica), gerando glicose-6-fosfato. A partir daí, a glicose-6-fosfato sofre diversas modificações pelas enzimas da via glicolítica, até a geração de piruvato. O piruvato entra na mitocôndria e é transformado em acetil-CoA, o qual será oxidado pelo ciclo de Krebs (1-3).

A transferência de elétrons do ciclo de Krebs para a cadeia de transporte de elétrons é mediada pela formação de NADH e FADH₂, resultando na geração de ATP. Portanto o metabolismo da glicose resulta num aumento da razão ATP/ADP no citosol, o qual leva ao fechamento dos canais para K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) presentes na membrana plasmática. Há, portanto um acúmulo de K⁺ (carga positiva), o que torna o potencial interno menos negativo, ou seja, provoca uma despolarização da membrana. Isto leva a abertura dos canais para Ca²⁺ do tipo L (sensíveis à voltagem) e o Ca²⁺, que está mais concentrado no meio extracelular, entra na célula de acordo com seu gradiente eletroquímico. Dessa forma, a concentração de Ca²⁺ intracelular se eleva. O rápido aumento de Ca²⁺ intracelular leva a mobilização e fusão com a membrana plasmática dos grânulos contendo insulina e consequente secreção do hormônio (1-3).

O metabolismo da glicose ativa a fosfolipase C (PLC), levando à formação de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Este último é um potente ativador de isoformas específicas da proteína quinase C (PKC), envolvida na fosforilação de enzimas que também participam da exocitose dos grânulos de insulina. O IP₃ promove a abertura dos canais para Ca²⁺, presentes na membrana do retículo endoplasmático, liberando mais Ca²⁺ para o citosol, potencializando o processo secretório (1-3).

Outros nutrientes, como aminoácidos e ácidos graxos também podem afetar marcadamente a secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS).

1.1.2 Ácidos graxos

Os ácidos graxos (AGs) se difundem livremente através da membrana plasmática das células beta e no interior da célula são convertidos a acil-CoAs de cadeia longa (LC-CoA) e transportados pela carnitina palmitoil transferase tipo I (CPT-I) para o interior da mitocôndria para serem beta-oxidados (4).

Em situações de altas concentrações de glicose, a oxidação dos AGs é inibida pela formação de malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase. O malonil-CoA, formado durante a oxidação da glicose inibe a CPT-I, bloqueando assim o transporte de LC-CoA para o interior da mitocôndria. O acúmulo de LC-CoA no citosol leva ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e a mudanças no estado de acilação de proteínas envolvidas na exocitose. O LC-CoA também pode aumentar a fusão das vesículas secretórias à membrana plasmática e daí aumentar a secreção de insulina (5).

Os AGs possuem um papel importante na função da célula beta. Evidências mostram que a depleção dos níveis de AGs na ilhota leva a prejuízo da secreção de insulina e que o restabelecimento dos níveis de AGs causa recuperação, sugerindo que os AGs intracelulares são importantes para a integridade da secreção de insulina (6).

Além disso, o estímulo agudo de AGs pode amplificar a GSIS (7-10), sendo que a potência de amplificação aumenta com o tamanho da cadeia carbônica e diminui com o grau de instauração (9, 11). Dessa forma, quanto maior a cadeia carbônica, mais potente o estímulo à secreção e quanto maior o grau de insaturação, menos potente é o estímulo (9, 11).

Um avanço recente no entendimento dos mecanismos pelos quais os ácidos graxos modulam a secreção de insulina foi a descoberta da expressão de receptores de membrana acoplados a proteína G ativados por ácidos graxos (GPRs) (12-15). Dentre eles, o GPR41 e o GPR43 são ativados por ácidos graxos de cadeia curta e o GPR120, por ácidos graxos insaturados de cadeia longa (16).

O receptor GPR40 é altamente expresso no Sistema Nervoso Central de humanos (12), em ilhotas pancreáticas de ratos e camundongos (12) e em linhagens celulares secretoras de insulina (7, 8). Tal receptor é ativado por ácidos graxos de cadeia média e longa, saturados (C12 – C18) ou insaturados (C18 a C20), tais como os ácidos palmítico, oleico e linoleico (8, 12, 14).

Após a ligação do ácido graxo ao GPR40, a proteína Gq é ativada, provocando estímulo da atividade da PLC, levando à hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em DAG e IP₃, que ativa a PKC e mobiliza cálcio do retículo endoplasmático, respectivamente (14, 16-19).

Estudos *in vitro* demonstram que a inibição do GPR40 provoca diminuição da secreção de insulina estimulada por ácidos graxos (7, 14). Além disso, ilhotas pancreáticas humanas de portadores de *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) apresentam expressão diminuída do GPR40 (20) e indivíduos obesos apresentam maior frequência de mutação do GPR40, levando a prejuízo no aumento da concentração intracelular de cálcio e, conseqüentemente, prejuízo na secreção de insulina (21).

Dessa forma, estudos recentes têm relacionado o GPR40 como possível alvo para a produção de novos fármacos para o tratamento do DM2 (22, 23). Moléculas agonistas já foram desenvolvidas (24, 25), algumas inclusive com biodisponibilidade oral (26, 27) e têm sido utilizadas em estudos de secreção de insulina. Uma delas, o TAK-875 foi o primeiro agonista do GPR40 a ser testado em portadores do DM2 e provocou diminuição da concentração plasmática de glicose e aumento da secreção de insulina. Porém, como o período de exposição ao fármaco foi muito curto (duas semanas), ainda não foi possível esclarecer o nível de atividade anti-hiperglicemiante e o grau de segurança de sua utilização (28).

No presente projeto foi utilizado o agonista GW9508, obtido em 2006 (24) e que apresenta estrutura bastante semelhante ao ácido linoleico, ácido graxo insaturado de cadeia longa (29). O GW9508 é um ativador mais potente do GPR40 comparado com outros AGs, tais como os ácidos linoleico, palmitoleico, α -linolênico e eicosapentaenoico (EPA). Apesar de também ativar o GPR120, o GW9508 é 100 vezes mais ativo para o GPR40 do que ao GPR120. A habilidade desse agonista em estimular a secreção de insulina é maior em concentrações mais elevadas de glicose, ou seja, a potencialização da secreção de insulina é glicose-dependente (25).

1.2 Lipotoxicidade

Apesar dos efeitos agudos benéficos de potencialização da GSIS, a exposição crônica a níveis elevados de AGs, particularmente saturados, pode provocar disfunção da célula beta com redução da biossíntese de insulina (30), da secreção de insulina (31, 32) e indução de apoptose (33, 34), fenômeno conhecido como lipotoxicidade (32-35).

A exposição crônica das células produtoras de insulina a ácidos graxos saturados de cadeia longa, como o ácido palmítico, é tóxica, provocando diminuição da GSIS e apoptose. Em contrapartida, ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como o ácido oleico, não apresentam toxicidade (34), além de apresentarem efeito protetor da toxicidade dos primeiros, ou seja, atenuam os efeitos tóxicos dos AGs saturados (36, 37).

Os mecanismos envolvidos na toxicidade provocada pelos ácidos graxos saturados de cadeia longa ainda são controversos e não completamente entendidos. Muitos mecanismos já foram sugeridos, tais como: (a) produção de ceramidas derivadas de ácidos graxos (38, 39); (b) estresse de retículo endoplasmático (40-43); (c) estimulação crônica do GPR40 (44-48); (d) geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por fontes mitocondriais e extra-mitocondriais, como a enzima NADPH oxidase, acompanhada pela redução da defesa antioxidante (35, 49), entre outros. Tais mecanismos não ocorrem isolados e podem estar interligados.

Em relação às ceramidas, o ácido palmítico promove a formação dessas substâncias em células beta (38) e o tratamento de ilhotas com análogos de ceramidas leva a perda de viabilidade (50). Adicionalmente, um inibidor da síntese de ceramidas (fumonisin-1B), atenuou a toxicidade induzida por palmitato em ilhotas de roedores (51) e humanas (37), sugerindo que a formação de ceramidas esteja envolvida na morte celular induzida por ácidos graxos.

Os demais possíveis mecanismos de ação da toxicidade dos ácidos graxos foram explorados no presente trabalho de pesquisa e serão detalhados nas sessões seguintes.

1.3 Ácidos graxos e estresse de retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático é uma importante organela presente em todas as células, especialmente desenvolvido naquelas que produzem e secretam proteínas, como as células beta pancreáticas. O retículo representa o local de tradução do RNA mensageiro (RNAm) em proteínas e de modificações pós-traducionais das proteínas, tais como dobramento, formação de pontes dissulfeto, glicosilação, entre outras (52).

O estresse de retículo endoplasmático (RE) é causado por aumento de proteínas mal dobradas, falha no dobramento/exportação de proteínas recém-sintetizadas e depleção de Ca^{2+} do RE. No processo de síntese proteica, pode ocorrer acúmulo de proteínas imaturas ou mal formadas, no lúmen do RE. A partir daí, um mecanismo de segurança, chamado de resposta da proteína mal dobrada (UPR), é ativado e tem como objetivo garantir que as proteínas sejam montadas de forma adequada. Para tanto, alguns processos são desencadeados: 1) aumento de expressão de chaperonas para aumentar a atividade de dobramento de proteínas e prevenir a agregação proteica; 2) atenuação da tradução, a fim de reduzir a síntese proteica e prevenir acúmulo adicional de proteínas mal dobradas; 3) degradação de proteínas mal dobradas; 4) apoptose, ativada quando o estresse de retículo é prolongado e a função dessa organela é extensamente prejudicada. Tais processos são desencadeados pelas proteínas: enzima que requer inositol 1 (IRE1), quinase do retículo *PKR-like* (PERK) e fator de ativação da transcrição (ATF6). No estado basal, estas três proteínas são inibidas pela ligação com a chaperona proteína de ligação (BiP) (53).

No estresse de retículo, o fator de transcrição ATF6 é translocado para o complexo de Golgi, onde é clivado na sua forma ativa, a qual induz a transcrição de chaperonas de retículo que vão auxiliar no enovelamento de proteínas (43). PERK é uma proteína quinase transmembrânica que, no estresse de retículo, fosforila a subunidade α do fator eucariótico de iniciação (eIF2 α), provocando inibição do processo de tradução de proteínas (54). IRE1 é uma proteína quinase transmembrânica que, quando ativada, processa uma região do RNAm do fator de transcrição XBP-1, o qual promove a transcrição de chaperonas e enzimas de degradação (43).

Figura 1 – Vias envolvidas no estresse de retículo endoplasmático.

Os mecanismos detalhados estão descritos no texto.

Fonte: Cnop (2010) (43).

O processo envolvido na degradação de proteínas mal dobradas é chamado de degradação associada ao retículo (ERAD), na qual as proteínas mal dobradas são detectadas pelo sistema de controle de qualidade do retículo, levadas ao citosol e degradadas. Como dito anteriormente, quando o estresse de retículo é severo e prolongado, uma resposta de morte celular por apoptose é ativada e envolve fatores de transcrição mediadores da apoptose (CHOP), quinases (JNK) e caspases (53).

Células beta pancreáticas possuem um RE altamente desenvolvido, necessário para estoques de Ca^{2+} , biossíntese de insulina e dobramento de pró-insulina recém-sintetizada. Portanto, as células beta são particularmente sensíveis ao estresse de RE, o qual está intimamente ligado à apoptose (53).

Nos últimos anos, o estresse de retículo tem sido relacionado com a lipotoxicidade, que leva ao prejuízo da célula beta e ao desenvolvimento do DM2 (43). Ácidos graxos livres podem desencadear o estresse de retículo e levar à disfunção da célula beta (40-43). Evidências sugerem que altos níveis de ácidos graxos, como o ácido palmítico, prolongadamente podem levar a depleção de Ca^{2+} do RE, o que poderia induzir estresse de RE e apoptose nas células beta (42). A indução do estresse de RE, levando a apoptose da célula beta está mais relacionada ao tratamento com AGs saturados, como o ácido palmítico, e não a AGs insaturados, como o ácido oleico (40). No entanto os mecanismos envolvidos na contribuição dos ácidos graxos para o desenvolvimento do estresse de retículo ainda não são totalmente conhecidos.

1.4 Estimulação crônica do GPR40

A contribuição do GPR40 com os efeitos crônicos tóxicos dos AGs já foram investigados por vários grupos (44-48), mas os resultados ainda são controversos.

Usando camundongo *knockout* para o GPR40, demonstrou-se a importância deste receptor para a secreção aguda de insulina. A ausência de GPR40 protegeu camundongos em dieta hiperlipídica de várias características associadas ao DM2 (hiperinsulinemia, intolerância a glicose e hipertrigliceridemia) e a superexpressão do GPR40 levou a disfunção da célula beta (44). Tais resultados sugerem que a superestimulação do GPR40 pode ser prejudicial a células beta em condições de hiperlipidemia.

A inibição do GPR40 com um antagonista (DC260126) protegeu uma linhagem de célula beta do estresse de retículo e apoptose induzidos pelo ácido palmítico após 48 horas de tratamento, mostrando um possível papel do GPR40 no desenvolvimento de estresse de retículo e apoptose em células beta (48).

No entanto, outros estudos mostram que a estimulação crônica do GPR40 não seria responsável por toxicidade. Após 72 horas de ativação do receptor com molécula agonista (Cpd-B), não houve disfunção do processo secretório em ilhotas isoladas (45). Além disso, a superexpressão de GPR40 em células beta pancreáticas melhorou a tolerância oral a glicose e a secreção de insulina (46).

Muitos pesquisadores tem apostado no desenvolvimento de fármacos agonistas do GPR40 para o tratamento de DM2 (22-28), porém, diante das

controvérsias apresentadas, os mecanismos envolvidos na estimulação crônica deste receptor ainda necessitam de estudos mais aprofundados e algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas para o desenvolvimento de fármacos seguros.

1.5 Espécies reativas de oxigênio

1.5.1 Enzima NADPH oxidase (estrutura e funcionalidade)

Nosso laboratório tem estudado a produção de espécies reativas de oxigênio, especialmente superóxido, por ácidos graxos e sua possível relação com a secreção de insulina e o funcionamento normal da célula beta.

Na célula, os principais locais de produção de superóxido são os complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial e a ativação da enzima NADPH oxidase (55).

A enzima NADPH oxidase, encontrada em células fagocitárias, é um complexo enzimático formado por três subunidades citosólicas (p47, p67 e p40) e duas subunidades de membrana (gp91 e p22). As subunidades gp91 e p22 são proteínas integrais de membrana, que formam o núcleo catalítico da enzima (56).

A ativação da enzima começa com a fosforilação da subunidade p47 pela PKC, promovendo a subsequente translocação das subunidades citosólicas para a membrana plasmática e sua associação com as subunidades de membrana. O complexo montado produz ânions superóxido através da redução de uma molécula de oxigênio, utilizando como doador de elétrons predominantemente uma molécula de NADPH. O superóxido produzido é importante para eliminação de bactérias e outros patógenos (56).

A expressão gênica e proteica desta enzima na célula beta pancreática foi demonstrada pela primeira vez em estudos de nosso laboratório (57). Em estudos posteriores, a utilização de oligonucleotídeo antisense para a subunidade p47 provocou diminuição do conteúdo de superóxido (58) e peróxido de hidrogênio em ilhotas isoladas, além de provocar diminuição da secreção de insulina (59). Porém a incubação com baixas doses de peróxido de hidrogênio provocou diminuição da secreção de insulina em ilhotas isoladas, mostrando um importante papel desta enzima no funcionamento da célula beta e no processo secretório, de forma que tanto baixas quanto altas concentrações de espécies reativas de oxigênio podem levar a um prejuízo da secreção de insulina (60).

1.5.2 Ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio

As EROs possuem um importante papel em processos fisiológicos como a eliminação de bactérias e outros patógenos e modulação da secreção de insulina (59). No entanto, também estão envolvidas em condições patológicas como diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

A exposição de células beta a altas concentrações de ácidos graxos leva a aumento da geração de EROs e, portanto, a toxicidade induzida por AGs pode ser mediada pela elevada produção de EROs. A fonte de EROs pode ser mitocondrial ou proveniente da enzima NADPH oxidase (35).

A expressão da subunidade p47 da enzima NADPH oxidase estava elevada após 24 horas de tratamento com ácido palmítico, enquanto o ácido araquidônico (AG poliinsaturado) não provocou tal aumento em células BRIN-BD11 (36). Além disso, foi visto que exposições curtas ao palmitato em presença de baixa concentração de glicose aumentam a produção de superóxido pela NADPH oxidase em células secretoras de insulina e ilhotas pancreáticas (58).

O estímulo agudo da secreção de insulina por ácidos graxos na presença de alta concentração de glicose é reduzido pela inibição da atividade da NADPH oxidase (61) e a redução da secreção de insulina pela exposição crônica ao palmitato é prevenida pela incubação de ilhotas de camundongo com um inibidor da NADPH oxidase (apocinina) (49).

Tais estudos mostram a importância da NADPH oxidase para o funcionamento normal de células beta pancreáticas, bem como a influência dos ácidos graxos, principalmente saturados, na expressão e atividade da enzima.

Para melhor estudar a interação entre NADPH oxidase e ácidos graxos em células beta pancreáticas, utilizamos neste projeto três inibidores da NADPH oxidase: apocinina, difenileneiodônio (DPI) e VAS2870. A apocinina inibe a translocação da subunidade p47 para a membrana, inibindo assim a formação do complexo (62). Consequentemente, há menor produção de espécies reativas de oxigênio. Já o DPI abstrai um elétron da oxidase, levando à formação de um aduto com a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e inibindo deste modo, a formação de superóxido (63).

VAS2870 é um inibidor da NADPH oxidase recém-sintetizado que age por mecanismos ainda desconhecidos (64). Em um estudo com células endoteliais, o aumento de espécies reativas de oxigênio na presença de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada foi revertido após incubação na presença de VAS2870 por duas horas (65). Em outro estudo a incubação de células musculares lisas vasculares com 10 μ M e 20 μ M de VAS2870 aboliu completamente a geração de espécies reativas de oxigênio pela enzima NADPH oxidase (66).

1.5.3 NADPH oxidase e estresse de retículo endoplasmático

A associação entre a geração de EROs e o estresse de retículo endoplasmático já é conhecida, inclusive em células beta pancreáticas. Células beta de camundongos diabéticos deficientes de CHOP mostraram-se mais resistentes ao estresse oxidativo (67) e em um modelo de rato deficiente de *elf2 α* fosforilado, as células beta exibiram aumento de apoptose e estresse oxidativo (68).

No entanto, a ligação entre estresse oxidativo relacionado à enzima NADPH oxidase e estresse de retículo endoplasmático, levando a apoptose ainda não foi suficientemente explorada.

Evidências recentes mostram que, em células cardíacas de camundongos diabéticos, o tratamento com inibidor da NADPH oxidase (apocinina) provocou inibição da expressão da enzima e da produção de EROs, além de inibição do estresse de RE. Efeito semelhante foi encontrado em camundongos *knockout* para *Rac1* (69).

Além disso, em macrófagos, alguns estressores do retículo aumentam a expressão da enzima NADPH oxidase e a deleção da enzima diminuiu a apoptose provocada por esses estressores e diminuiu a expressão de alguns marcadores do estresse de retículo (ATF4 e CHOP) (70).

Apesar das evidências existentes em outros tipos celulares, a relação entre NADPH oxidase e estresse de RE em células beta pancreáticas ainda requer maiores investigações.

2 JUSTIFICATIVA

A exposição aguda das células beta pancreáticas a ácidos graxos saturados está relacionada ao aumento da secreção de insulina, enquanto que a exposição crônica leva à disfunção da célula beta. A produção de espécies reativas de oxigênio por ácidos graxos está ligada ao estresse oxidativo, o qual leva à disfunção da célula beta e ao desenvolvimento de diabetes tipo 2. Além disso, a exposição crônica a ácidos graxos pode levar ao estresse de retículo, o qual pode estar relacionado à enzima NADPH oxidase.

BRIN-BD11 é uma nova linhagem celular desenvolvida após a eletrofusão das células RINm5F com células de ilhota de rato e possui características semelhantes às células beta pancreáticas normais, com a vantagem de sobreviver em cultura por mais tempo. Dessa forma, é uma ferramenta útil para a realização de técnicas que requerem longo tempo de incubação.

Assim, pretendeu-se explorar como mecanismos de lipotoxicidade o estresse de retículo, a estimulação crônica do GPR40 e a geração de espécies reativas de oxigênio pela enzima NADPH oxidase, bem como as possíveis relações entre NADPH oxidase e estresse de retículo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, em células secretoras de insulina, o conteúdo de superóxido, a apoptose, a expressão de marcadores do estresse de retículo e a secreção de insulina após incubação com ácido palmítico ou com o agonista do GPR40 GW9508 na presença ou ausência de inibidores da NADPH oxidase.

3.2 Objetivos específicos

- ◆ estabelecer os protocolos a serem utilizados na cultura da linhagem BRIN-BD11 (meio de incubação e concentração de DHE);
- ◆ avaliar o conteúdo de superóxido total pela linhagem BRIN-BD11 após incubação na presença ou ausência de ácido palmítico ou GW9508 (ativador do GPR40) por 1 hora, 24 horas ou 48 horas;
- ◆ avaliar o conteúdo de superóxido total de células BRIN-BD11 após tratamento de 48 horas com ácido palmítico ou GW9508 na presença ou ausência de VAS2870 (inibidor da NADPH oxidase)
- ◆ comparar os resultados obtidos após 48 horas de tratamento com VAS2870 e ácido palmítico com outros inibidores da NADPH oxidase (apocinina e DPI);
- ◆ avaliar a apoptose de células BRIN-BD11 após tratamento de 48 horas com ácido palmítico ou GW9508 na presença ou ausência de VAS2870;
- ◆ avaliar o estresse de retículo, por Western Blotting, de células BRIN-BD11 após tratamento de 48 horas com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870;
- ◆ avaliar a secreção estática de insulina e o conteúdo de insulina de ilhotas pancreáticas de ratos após tratamento de 48 horas com ácido palmítico ou GW9508.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura das células BRIN-BD11

As células BRIN-BD11 foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v), 0,1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina) e 11,1 mM de glicose em pH 7,4. As células foram mantidas em incubadora (Nuair, Plymouth, MA, Estados Unidos) a 37 °C em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂), em 10-15 ml de meio de cultura em frascos para cultura estéreis.

4.2 Testes de meio de cultura

As células BRIN-BD11 foram mantidas até 72 horas em placas de 24 poços com meio RPMI 1640 (Gibco) com 1% de SFB e 1% de albumina livre de ácidos graxos (ALAG). Foram testados diferentes volumes de incubação: 500 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl e 1000 µl. Para cada volume de incubação com meio RPMI 1% SFB e 1% ALAG, foi feito um respectivo controle com meio RPMI 10% SFB.

4.3 Determinação da concentração de DHE

$2,5 \times 10^5$ células foram incubadas em meio RPMI 1640 (Gibco) com 11,1 mM de glicose em pH 7,4 e mantidas a 37 °C até o dia seguinte em atmosfera de 5% CO₂. Após o período de incubação, o meio foi trocado por RPMI com diferentes concentrações de glicose (5,6, 11,1 ou 16,7 mM) e as células foram incubadas por 1 hora. Após 1 hora, o dihidroetídeo (DHE) (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) foi adicionado diretamente no meio de incubação e as células foram mantidas por 20 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. As concentrações de DHE testadas foram: 5, 18, 21, 23, 25, 30, 35 e 40 µM. As células foram lavadas com solução salina de tampão fosfato (PBS), tripsinizadas (100 µl de tripsina) e a tripsina foi neutralizada com 200 µl de meio de cultura RPMI. O volume final total foi colocado na placa de leitura e a fluorescência das células em suspensão foi

analisada por citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos).

4.4 Cultura das células BRIN-BD11 com ácido palmítico ou GW9508 e/ou inibidor da NADPH oxidase (VAS2870, apocinina ou DPI)

As células foram incubadas por diferentes períodos de tempo (1 hora, 24 horas ou 48 horas) na ausência ou presença de diferentes concentrações de ácido palmítico (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) ou GW9508 (Tocris Bioscience, Bristol, Inglaterra) na presença ou ausência de VAS2870 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, Estados Unidos), apocinina (Sigma-Aldrich) ou difenileneiodônio (DPI) (Sigma-Aldrich) em placas de 24 poços ou em garrafas para cultura estéreis em atmosfera 5% CO₂ a 37 °C.

Em seguida, as células foram utilizadas nos ensaios de conteúdo de superóxido total por citometria de fluxo, avaliação de apoptose por citometria de fluxo e avaliação de proteínas do estresse de retículo endoplasmático por Western Blotting.

4.5 Conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11

O conteúdo de superóxido total foi avaliado por intermédio do dihidroetídeo (DHE) ou hidroetidina (HE) (Invitrogen). A HE (excitação em 488 nm e emissão em 610 nm) é uma sonda fluorescente, livremente permeável às células na presença de superóxido e muito sensível a óxido-redução. A reação entre o superóxido e a HE resulta na formação de um produto oxidado, o brometo de etídeo, que se liga ao DNA, corando o núcleo com fluorescência vermelha.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços para análise do conteúdo de superóxido. Como a linhagem BRIN-BD11 apresenta um período de duplicação de aproximadamente 24 horas, para cada tempo de incubação foi estabelecido um número diferente de células por poço: $2,5 \times 10^5$ células/poço para experimentos de 1 hora; $1,25 \times 10^5$ células/poço para experimentos de 24 horas; $6,25 \times 10^4$ células/poço para experimentos de 48 horas.

As células BRIN-BD11 já incubadas em meio RPMI receberam diferentes estímulos, de acordo com o experimento:

a) Ácido palmítico (100, 150 ou 200 μM) em 5,6 ou 16,7 mM de glicose por 1, 24 ou 48 horas;

b) Ácido palmítico (100 μM) em 11,1 mM de glicose na presença ou ausência de VAS2870 (5 ou 10 μM), apocinina (25, 50 ou 100 μM) ou DPI (5 ou 10 nM) por 48 horas;

c) GW9508 (20, 50, 100, 150 ou 200 μM) em 5,6 ou 16,7 mM de glicose por 1, 24 ou 48 horas;

d) GW9508 (20 ou 100 μM) em 11,1 mM de glicose na presença ou ausência de VAS2870 (5 ou 10 μM).

Após o período de incubação, as células foram incubadas com 40 μM de DHE por 20 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz, sob agitação. A fluorescência foi detectada por citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Millipore).

4.6 Apoptose de células BRIN-BD11

A apoptose das células BRIN-BD11 foi avaliada pelo reagente VIA COUNT (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos). O VIA COUNT possui dois corantes de ligação ao DNA para identificar as células viáveis, mortas e em processo de apoptose.

$0,6 \times 10^5$ células foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI 1640 com 11,1 mM de glicose em pH 7,4 e mantidas até o dia seguinte em atmosfera de 5% CO_2 , a 37 °C. Após o período de incubação, o meio foi substituído por RPMI com 11,1 mM de glicose e os diferentes estímulos (100 μM de ácido palmítico na ausência ou presença de 10 μM de VAS2870 ou 20 ou 100 μM de GW9508 na ausência ou presença de 10 μM de VAS2870) e as células foram incubadas por 48 horas. Após as 48 horas, o meio de incubação foi guardado (pois possui células mortas), as células aderidas foram lavadas com PBS, tripsinizadas (100 μl de tripsina) e a tripsina foi neutralizada com 150 μl de meio de cultura RPMI. O volume final total mais o meio de incubação guardado anteriormente foram transferidos para eppendorf e centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspensionado em 50 μl de meio RPMI com 11,1 mM de glicose. Foram transferidos 25 μl da suspensão para placa de leitura contendo 225 μl de reagente VIA COUNT (Millipore). As células foram mantidas por cinco minutos na ausência de luz, à temperatura ambiente. Após a incubação, a leitura da

fluorescência das células em suspensão foi analisada por citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Millipore).

4.7 Estresse de retículo

O estresse de retículo foi avaliado através da expressão de marcadores (PERK fosforilado, PERK total, elf2 α fosforilado, elf2 α total e CHOP-10) por Western Blotting. Para tanto, as células foram incubadas em garrafas de 25 cm² (1 x 10⁶ células/garrafa) em 5 ml de meio RPMI com 11,1 mM de glicose de um dia para o outro, em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte, as células receberam os diferentes estímulos (100 μ M de ácido palmítico em 11,1 mM de glicose na presença ou ausência de 10 μ M VAS2870) e foram incubadas por 48 horas.

Após o período de incubação, foi feita a extração de proteína utilizando o tampão de lise RIPA (Thermo Scientific). A leitura da concentração de proteína em cada amostra foi feita pelo reagente Pierce (Thermo Scientific), utilizando padrões de albumina bovina que já vem prontos no kit. Em cada amostra foi adicionado tampão Laemmli contendo ditioneitol (DTT) (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) para quebra das pontes dissulfeto. A mistura foi fervida por 5 minutos. Cerca de 30 μ g de proteína total juntamente com marcador de peso molecular pré-corado (Bio-Rad) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8,5% ou 12%) seguida de transferência para membrana de PVDF (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) utilizando aparato para transferência Bio-Rad.

Após a transferência, as membranas foram tratadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado) por duas horas, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução basal (três lavagens de dez minutos cada) e incubadas *overnight* com anticorpos primários de proteínas relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático ou anti- α -tubulina (Invitrogen) (diluição 1:2000 em solução de albumina bovina a 3%) como proteína constitutiva. Após o período de incubação, as membranas foram novamente lavadas com solução basal (três lavagens de dez minutos cada) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Alemanha) por 1 hora, à temperatura ambiente. Finalmente as membranas foram lavadas com solução basal (três lavagens de dez minutos cada) e posteriormente reveladas. Para revelação, as membranas foram expostas ao reagente ECL (GE Healthcare, Oslo, Noruega) e as

imagens foram capturadas pelo aparelho Image Quant 350 (GE Healthcare, Oslo, Noruega). A análise quantitativa das bandas foi feita por densitometria com o auxílio do programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos).

A **tabela 1** apresenta as proteínas analisadas, bem como os respectivos anticorpos utilizados.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para análise da expressão proteica.

Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Fabricante	Concentração
elf2 α fosforilado	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
elf2 α total	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
CHOP-10	Rabbit	Sigma	1:400
PERK fosforilado	Rabbit	Santa Cruz	1:400
PERK total	Rabbit	Santa Cruz	1:400
α -tubulina	Mouse	Millipore	1:2000

4.8 Animais

Para os experimentos de secreção e conteúdo de insulina, foram utilizados ratos Wistar machos, com aproximadamente 60 a 90 dias de vida. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) à temperatura de 23 ± 2 °C sob ciclo iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas.

4.9 Isolamento de ilhotas de Langerhans

Os animais foram eutanasiados para a obtenção das ilhotas e realização dos experimentos. O isolamento das ilhotas foi feito pelo método da collagenase (0,7 mg/ml - Collagenase Type V – Sigma-Aldrich) proposto por Lacy & Kostianovsky (1967) (71) e modificado como descrito por Carpinelli, Curi & Malaisse (1992). Os animais foram colocados em uma câmara de CO₂ e decapitados. Foram submetidos

à antissepsia da região abdominal com álcool 70%. Foi realizada a laparotomia mediana e a exposição do ducto biliar que será clampeado na sua extremidade distal e dissecado próximo ao pedículo hepático, por onde foi introduzida uma cânula de polietileno e injetados, por via retrógrada, cerca de 20 ml de solução de colagenase em Hanks. A solução de Hanks contém NaCl 8 g/l, KCl 0,4 g/l, CaCl_2 0,14 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,20 g/l, NaH_2PO_4 0,48 g/l, KH_2PO_4 0,06 g/l, NaHCO_3 0,35 g/l, H_2O (qsp): 1 litro. Após inflar o pâncreas, o mesmo foi retirado e colocado em placa de Petri para dissecação de gânglios linfáticos, tecido adiposo e vasos sanguíneos, sendo fragmentado em pedaços e depositado em tubo falcon. A preparação foi colocada em banho-maria a 37 °C durante 25 minutos. A seguir, foi agitado manualmente para separação da porção exócrina e endócrina. Após a homogeneização, a mistura foi deixada em repouso por sete minutos e após este período o sobrenadante foi aspirado. O volume do tubo falcon foi completado com Hanks e novamente a mistura (produto de digestão + solução de Hanks) foi homogeneizada. Este procedimento de lavagem foi repetido de 3 a 4 vezes. Após a lavagem com Hanks foi realizada a coleta das ilhotas pancreáticas com micropipeta e lupa.

4.10 Cultura das ilhotas

Grupos de 200-300 ilhotas foram incubadas *overnight* em placas para cultura estéreis de 60 cm² em meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 10 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina, em atmosfera de 5% CO₂, 37 °C.

Após o período de incubação, as ilhotas foram recoletadas com o auxílio de uma micropipeta e transferidas para placas de seis poços (cinco ilhotas por poço e cada condição em duplicata) com diferentes estímulos e mantidas por 48 horas. Os estímulos foram: presença ou ausência de 100 µM de ácido palmítico ou 100 µM de GW9508 em 5,6 ou 16,7 mM de glicose.

4.11 Secreção estática de insulina

Após o período de incubação de 48 horas, as ilhotas foram submetidas a um estímulo agudo de glicose (5,6 ou 16,7 mM). Para tanto, as ilhotas foram retiradas

do meio de incubação e pré-incubadas, sob agitação, em 500 µl de Krebs Henseleit em 5,6 mM de glicose por 30 minutos a 37 °C. Após a retirada do meio de pré-incubação, as ilhotas foram incubadas, sob agitação, em 500 µl de Krebs com diferentes concentrações de glicose (5,6 ou 16,7 mM) por 1 hora a 37 °C. O sobrenadante foi removido e estocado a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio. As ilhotas foram ressuspensas em 500 µl de uma solução de álcool-ácido (52 ml etanol, 17 ml água, 1 ml ácido clorídrico) e rapidamente sonicadas em aparelho sonicador (Sonics & Materials, Newtown, CT, Estados Unidos), provocando o rompimento das células para dosagem do conteúdo intracelular de insulina.

4.12 Dosagem de insulina por radioimunoensaio

A quantidade de insulina secretada foi determinada por radioimunoensaio. Foi feita uma solução reagente, contendo uma quantidade conhecida de anticorpo, uma quantidade conhecida do hormônio marcado radioativamente (insulina marcada com iodo – ^{125}I , PerkinElmer, Turku, Finlândia) e uma quantidade desconhecida de hormônio não radioativo (amostra). As duas formas de hormônio (radioativa e amostra não-radioativa) competem pelos mesmos locais de ligação no anticorpo. Portanto, quanto mais hormônio não-radioativo (amostra) estiver presente, menos o hormônio radioativo irá se ligar.

O complexo insulina-anticorpo marcado formado foi precipitado com polietilenoglicol e dosado em contador do tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). De acordo com a curva-padrão de concentrações conhecidas de hormônio radioativo, foi determinada a concentração do hormônio não-radioativo em cada amostra.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prisma 5 (La Jolla, CA, Estados Unidos). One-way ANOVA com pós-teste Tukey foi usada para comparar valores entre múltiplos grupos; Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni foi

usado para comparar múltiplas medidas inter-relacionadas entre grupos. Valor de $p < 0,05$ foi adotado como limite mínimo de significância.

Nos experimentos de avaliação do conteúdo de superóxido, os resultados foram expressos em unidades arbitrárias. Foi feita uma normalização dos dados da seguinte forma: uma condição experimental (controle) recebeu o valor 1 (Unidades Arbitrárias) e as demais condições foram a variação sobre esta condição específica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com ácido palmítico por 1 hora, 24 horas ou 48 horas

Nosso objetivo inicial era avaliar se a exposição aguda ou crônica a diferentes concentrações de ácido palmítico levava a maior produção de superóxido. Para tanto, avaliamos o conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 após incubação com ácido palmítico por diferentes períodos de tempo (1 hora, 24 horas ou 48 horas) em 5,6 ou 16,7 mM de glicose (figuras 2 e 3).

Figura 2 – Conteúdo de superóxido em diferentes períodos de tempo após incubação com ácido palmítico em 5,6 mM de glicose

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100, 150 ou 200 μ M de ácido palmítico em 5,6 mM de glicose por 1 hora, 24 horas ou 48 horas. 1 hora e 24 horas: seis experimentos independentes cada; 48 horas: cinco experimentos independentes. Todas as condições em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Figura 3 – Conteúdo de superóxido em diferentes períodos de tempo após incubação com ácido palmítico em 16,7 mM de glicose

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100, 150 ou 200 μ M de ácido palmítico em 16,7 mM de glicose por 1 hora, 24 horas ou 48 horas. 1 hora e 24 horas: seis experimentos independentes cada; 48 horas: cinco experimentos independentes. Todas as condições em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Agudamente, há um aumento no conteúdo de superóxido em 150 μ M e 200 μ M de ácido palmítico em 5,6 mM de glicose (figura 2) e em 200 μ M de ácido palmítico em 16,7 mM de glicose (figura 3). No entanto, após 24 horas de exposição, esse aumento é revertido (figuras 2 e 3), provavelmente por um aumento da atividade do sistema de defesa antioxidante da célula. Porém o conteúdo de superóxido volta a aumentar após 48 horas, quando ocorreria uma possível falência desse sistema. O aumento de superóxido é significativo apenas em baixa concentração de glicose (figura 2) porque na presença de 16,7 mM de glicose as defesas antioxidantes estão mais ativadas do que em 5,6 mM (72, 73). Apenas os resultados com 100 μ M de ácido palmítico em 48 horas estão apresentados, pois acima desta concentração as células morrem.

Como o aumento crônico de superóxido foi observado a partir de 48 horas, os experimentos posteriores foram realizados apenas nesse tempo de incubação.

5.2 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas

Em seguida, a fim de avaliar a participação da enzima NADPH oxidase na produção de superóxido pelo ácido palmítico, realizamos a análise do conteúdo de superóxido após incubação de células BRIN-BD11 em meio contendo 11,1 mM de glicose e 100 μ M de ácido palmítico na ausência ou presença do inibidor da enzima NADPH oxidase (VAS2870) por 48 horas (figura 4).

Figura 4 – Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) ou 5 μ M de VAS2870 (VAS 5) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS 10) ou 100 μ M de ácido palmítico e 5 μ M de VAS2870 (AP VAS 5) ou 100 μ M de ácido palmítico e 10 μ M de VAS2870 (AP VAS 10) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Cinco experimentos independentes com triplicatas entre as condições. * p <0,05 quando comparado ao controle; # p <0,05 quando comparado ao AP; & p <0,05 quando comparado ao VAS5; % p <0,05 quando comparado ao VAS10. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

Ao analisarmos a figura 4, notamos que o ácido palmítico provocou um aumento no conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação em 11,1 mM (concentração de glicose na qual a linhagem BRIN-BD11 é normalmente mantida), compatível com o ocorrido nos experimentos anteriores em 5,6 mM de glicose (figura 2). VAS2870 não foi capaz de reverter completamente o aumento de superóxido provocado pelo ácido palmítico, já que AP VAS 5 e AP VAS 10 são estatisticamente diferentes em relação ao controle. No entanto, o aumento foi em parte revertido pelo fármaco, já que AP VAS 5 e AP VAS 10 são estatisticamente diferentes de AP.

Não podemos afirmar que o VAS2870 provocou inibição completa da enzima NADPH oxidase. Além disso, como o DHE mede o conteúdo de superóxido total, inibindo a NADPH oxidase com VAS2870, ainda temos a fonte mitocondrial de superóxido. Os resultados mostram, portanto, que a NADPH oxidase é importante para a produção crônica de superóxido pelo ácido palmítico, porém pode não ser a única fonte desta espécie reativa.

5.3 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de apocinina ou DPI por 48 horas

A fim de confirmar os resultados obtidos com VAS2870, utilizamos dois outros inibidores da NADPH oxidase: apocinina e DPI. Na figura 5 observamos um aumento no conteúdo de superóxido após incubação com ácido palmítico. Tal aumento não foi revertido após incubação com apocinina na presença de ácido palmítico (AP APO) em nenhuma das três concentrações de apocinina utilizadas. Portanto, a apocinina não provocou o mesmo efeito do VAS2870.

Figura 5 – Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de diferentes concentrações de apocinina

Células BRIN-BD11 foram tratadas com diferentes concentrações de apocinina: 25 μ M (APO 25), 50 μ M (APO 50) ou 100 μ M (APO 100) na ausência ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP APO) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Oito experimentos independentes com duplicatas entre as condições. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle (CTR). One-Way ANOVA com pós-teste Tukey.

Em relação ao DPI, testamos diversas concentrações entre 10 μ M (concentração usada por nosso grupo agudamente em ilhotas de rato) e 5 nM. Em concentrações acima de 10 nM as células morrem. No gráfico da figura 6 observamos mais uma vez um aumento no conteúdo de superóxido com ácido palmítico. O DPI não foi capaz de reverter tal aumento, no entanto é importante notar que nas condições em que havia ácido palmítico na presença de DPI (AP DPI) não houve diferença estatística em relação ao controle (CTR), nem em relação ao ácido palmítico (AP). Portanto, o DPI não provocou a reversão de efeito do ácido palmítico observada após tratamento com VAS2870, mas obtivemos uma condição intermediária entre o controle e o ácido palmítico.

Figura 6 – Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de diferentes concentrações de DPI

Células BRIN-BD11 foram tratadas com diferentes concentrações de DPI: 10 nM (DPI 10) ou 5 nM (DPI 5) na ausência ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP DPI) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Cinco experimentos independentes com duplicatas entre as condições. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle (CTR). One-Way ANOVA com pós-teste Tukey.

5.4 Avaliação da viabilidade celular após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas

Ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico, estão relacionados à apoptose de células beta em incubações crônicas (33, 34). Portanto, avaliamos a apoptose de células BRIN-BD11 após o tratamento de 48 horas com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870. Os resultados estão divididos em: porcentagem de células viáveis e não viáveis (somatório de células em apoptose e mortas) (figura 7), porcentagem de células em apoptose (figura 8) e porcentagem de células mortas por apoptose (figura 9).

O tratamento crônico com ácido palmítico provocou diminuição na viabilidade celular (figura 7), a qual foi revertida pela inibição da NADPH oxidase com VAS2870 (figura 7).

Figura 7 – Porcentagem de células viáveis e não viáveis após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 100 μ M de ácido palmítico e 10 μ M de VAS2870 (AP VAS) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle e # $p < 0,05$ em relação ao ácido palmítico. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

Figura 8 – Porcentagem de células em apoptose após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 100 μ M de ácido palmítico e 10 μ M de VAS2870 (AP VAS) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

Figura 9 – Porcentagem de células mortas após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 100 μ M de ácido palmítico e 10 μ M de VAS2870 (AP VAS) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Cinco experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre as condições. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

A diminuição na viabilidade celular observada após o tratamento crônico com ácido palmítico (figura 7) foi decorrente do aumento de células em processo de apoptose (figura 8). Importante notar que o tratamento de 48 horas com ácido palmítico não provoca aumento de células mortas (figura 9), mas sim de células em apoptose (figura 8), ou seja, em 48 horas de incubação as células começam a entrar em apoptose e, provavelmente, se o estímulo fosse mantido por mais tempo, a porcentagem de células mortas seria maior do que o controle.

Como a inibição da enzima NADPH oxidase foi capaz de reverter a queda na viabilidade celular provocada pelo ácido palmítico e a queda na viabilidade aconteceu graças ao aumento de células em apoptose, sugerimos que a NADPH oxidase participa da apoptose provocada pelo tratamento crônico com ácido palmítico. Resultados semelhantes foram obtidos em macrófagos, em que a deleção da enzima diminuiu a apoptose provocada por alguns conhecidos estressores do retículo endoplasmático (70).

5.5 Avaliação de marcadores do estresse de retículo endoplasmático após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas

Ácidos graxos livres podem desencadear o estresse de retículo e levar à disfunção da célula beta (40-43). Evidências sugerem que altos níveis de ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico, podem levar ao estresse de RE e consequente disfunção e apoptose de células beta (42). Baseados nos resultados de viabilidade celular e apoptose, nos quais observamos que a inibição da NADPH oxidase provocou uma melhora da viabilidade celular e redução da apoptose provocada pelo ácido palmítico e pelo fato de existirem evidências da ligação entre a NADPH oxidase e o estresse de RE em outros tipos celulares (69, 70), postulamos a hipótese de que a inibição da NADPH oxidase poderia proteger as células através da atenuação do estresse de retículo.

A fim de verificar essa hipótese, avaliamos a expressão de alguns marcadores do estresse de retículo (PERK total, PERK fosforilado, elf2 α total, elf2 α fosforilado e CHOP-10) após incubação de 48 horas com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870 (figuras 10, 11 e 12).

Figura 10 – Expressão proteica de PERK fosforilado em relação a PERK total após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 100 μ M de ácido palmítico e 10 μ M de VAS2870 em 11,1 mM de glicose por 48 horas. A análise do Western Blotting foi realizada utilizando anticorpo anti-PERK fosforilado e anti-PERK total. Dez experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

Observamos um aumento na expressão proteica de PERK fosforilado/PERK total após a incubação com ácido palmítico. A inibição da NADPH oxidase com VAS2870 provocou reversão parcial desse efeito, já que a condição de ácido palmítico na presença de VAS2870 (AP VAS) não é diferente estatisticamente do controle nem do ácido palmítico.

Figura 11 – Expressão proteica de elf2 α fosforilado em relação a elf2 α total após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 100 μ M de ácido palmítico e 10 μ M de VAS2870 em 11,1 mM de glicose por 48 horas. A análise do Western Blotting foi realizada utilizando anticorpo anti-elf2 α fosforilado e anti-elf2 α total. Dez experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre as condições. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

Figura 12 – Expressão proteica de CHOP-10 após 48 horas de incubação com ácido palmítico na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 100 μ M de ácido palmítico e 10 μ M de VAS2870 em 11,1 mM de glicose por 48 horas. A análise do Western Blotting foi realizada utilizando anticorpo anti-CHOP-10 e anti- α -tubulina, como proteína constitutiva. Dez experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre as condições. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

Não obtivemos diferença estatística para os outros dois marcadores avaliados: elf2 α e CHOP-10. Portanto, a NADPH oxidase pode ter alguma participação no estresse de retículo provocado pelo ácido palmítico, no entanto tal hipótese ainda não pode ser confirmada com base nas proteínas avaliadas até o momento. Estudos mais aprofundados são necessários para avaliar uma possível relação entre NADPH oxidase e estresse de RE, bem como analisar qual estímulo é precedente: estresse de retículo ou estresse oxidativo.

Em células INS-1E, o tratamento com ácido palmítico provocou aumento da expressão de diversos marcadores do estresse de retículo em tempos menores de incubação (6 e 12 horas). Em 24 e 48 horas, a resposta se mostrou menos acentuada do que nos tempos anteriores (42). Portanto, é possível que a fosforilação dessas proteínas ocorra em tempos de incubação menores do que os tempos avaliados neste trabalho.

5.6 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com GW9508 por 1 hora, 24 horas ou 48 horas

Sabe-se que a via do GPR40 é importante para a ação do ácido palmítico na célula beta, já que a inibição deste receptor em células INS-1E provocou perda da capacidade do ácido palmítico em aumentar os níveis intracelulares de cálcio e a secreção de insulina (14). Portanto, avaliamos se os efeitos observados com o ácido palmítico ocorrem via GPR40.

Para tanto, avaliamos o conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 após incubação na presença de diferentes concentrações de GW9508 (agonista do GPR40) em diferentes períodos de tempo (figuras 13, 14, 15, 16 e 17).

Figura 13 – Conteúdo de superóxido após 1 hora de incubação com GW9508 em 5,6 mM ou 16,7 mM de glicose

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 20 μ M (GW 20), 50 μ M (GW 50) ou 100 μ M (GW 100) de GW9508 em 5,6 mM ou 16,7 mM de glicose por 1 hora. 20 μ M: três experimentos independentes; 50 μ M: um experimento; 100 μ M: quatro experimentos independentes. Todas as condições em triplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Agudamente, observamos uma redução no conteúdo de superóxido após incubação na presença de 20 μ M GW9508, concentração compatível com aquela utilizada na literatura. Observamos aumento no conteúdo de superóxido apenas na concentração cinco vezes mais alta, 100 μ M (figura 13).

Com o aumento da concentração de GW9508, foi possível observar um aumento na fluorescência e, portanto no conteúdo de superóxido das células BRIN-

BD11 após exposição aguda de 1 hora a 150 μ M e 200 μ M de GW9508, tanto em 5,6 (figura 14) quanto em 16,7 mM de glicose (figura 15).

Mesmo após 24 horas de incubação, o GW9508 ainda provoca o aumento do conteúdo de superóxido em 150 μ M e 200 μ M em ambas as concentrações de glicose (5,6 e 16,7 mM) (figuras 14 e 15).

Apenas os resultados com 100 μ M de GW9508 em 48 horas estão apresentados (figuras 14 e 15), pois acima desta concentração as células morrem. Concentrações maiores que 100 μ M devem ser muito tóxicas e provocar morte celular por mecanismos ainda desconhecidos, que merecem investigação.

Figura 14 – Conteúdo de superóxido em diferentes períodos de tempo após incubação com GW9508 em 5,6 mM de glicose

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M (GW 100), 150 μ M (GW 150) ou 200 μ M (GW 200) de GW9508 em 5,6 mM de glicose por 1 hora, 24 horas ou 48 horas. 100 μ M: quatro experimentos independentes; 150 e 200 μ M: três experimentos independentes cada. Todas as condições em triplicata. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparados com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Figura 15 – Conteúdo de superóxido em diferentes períodos de tempo após incubação com GW9508 em 16,7 mM de glicose

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M (GW 100), 150 μ M (GW 150) ou 200 μ M (GW 200) de GW9508 em 16,7 mM de glicose por 1 hora, 24 horas ou 48 horas. 100 μ M: quatro experimentos independentes; 150 e 200 μ M: três experimentos independentes cada. Todas as condições em triplicata. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparados com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Como a concentração utilizada nos experimentos descritos (100 μ M) é muitas vezes mais alta que as concentrações normalmente utilizadas em estudos agudos (10 a 40 μ M) (25, 75), fizemos os experimentos crônicos de superóxido também na concentração mais baixa de GW9508 (20 μ M) e verificamos que após 24 horas houve diminuição, ao invés de aumento, no conteúdo de superóxido em 5,6 e 16,7 mM de glicose (figura 16). E após 48 horas, não houve diferença em relação ao controle em 11,1 mM de glicose (figura 17).

Figura 16 – Conteúdo de superóxido após 24 horas de incubação com GW9508 em 5,6 ou 16,7 mM de glicose

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 20 μ M de GW9508 (GW 20) em 5,6 mM ou 16,7 mM de glicose por 24 horas. Dois experimentos independentes com triplicatas entre as condições. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparados com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Figura 17 – Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com GW9508 em 11,1 mM de glicose

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 20 μ M de GW9508 (GW 20) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Seis experimentos independentes com triplicatas entre as condições. Não houve diferença estatística entre as condições.

Portanto, na concentração de 20 μ M de GW9508, compatível com as concentrações utilizadas em outros estudos publicados (25, 75), temos redução

aguda do conteúdo de superóxido em 16,7 mM de glicose, redução de superóxido em 5,6 e 16,7 mM de glicose em 24 horas de incubação e após 48 horas não há diferenças em relação ao controle. O aumento de superóxido é observado apenas em concentrações muito mais altas (acima de 100 μ M).

Não existem estudos de exposição crônica ao GW9508, agonista do receptor GPR40 utilizado no presente trabalho. No entanto, resultados referentes à estimulação crônica ou à deleção deste receptor e seus efeitos na secreção de insulina e no funcionamento da célula beta ainda são bastante controversos. Camundongos *knockout* para o GPR40 foram protegidos do desenvolvimento de hiperinsulinemia e intolerância a glicose quando expostos a dieta hiperlipídica. Além disso, a superexpressão de GPR40 em células beta levou a um prejuízo na secreção de insulina e ao desenvolvimento de diabetes (44). Em outro estudo, foi visto que a inibição do GPR40 com um antagonista (DC260126) protegeu a linhagem de célula beta MIN6 do estresse de retículo e apoptose induzidos pelo ácido palmítico após 48 horas de tratamento, mostrando um possível papel do GPR40 no desenvolvimento de estresse de retículo em células beta (48).

Tais resultados contradizem outros estudos que mostram que a estimulação crônica do GPR40 não seria responsável por toxicidade. Após 72 horas de ativação do receptor com molécula agonista (Cpd-B), não houve disfunção do processo secretório em ilhotas isoladas (45). Além disso, a superexpressão de GPR40 em células beta pancreáticas melhorou a tolerância oral a glicose e a secreção de insulina (46).

As discrepâncias apresentadas são indicativas da complexidade dos mecanismos envolvidos. Os GPRs fornecem bons exemplos de receptores cujo alvo terapêutico pode trazer reais benefícios a pacientes, mas para isso há obstáculos para caracterizar sua farmacologia e desenvolver ligantes sintéticos seletivos e seguros.

Nossos resultados sugerem que a estimulação aguda ou crônica do receptor GPR40 com concentrações normalmente utilizadas não seja prejudicial à célula beta pancreática.

5.7 Conteúdo de superóxido com DHE após incubação com ácido palmítico na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas

Os experimentos de superóxido na presença de GW9508 e VAS2870 foram feitos com 20 ou 100 μ M de GW9508. No entanto, na presença de 100 μ M de GW9508 e VAS2870 as células morrem e, portanto apresentamos apenas os resultados com 20 μ M de GW9508. Ao analisarmos a figura 18, vemos que o GW9508 mais uma vez não provocou aumento no conteúdo de superóxido, compatível com o observado na figura 17. Além disso, a inibição da enzima NADPH oxidase não provocou diferença em relação ao controle.

Figura 18 – Conteúdo de superóxido após 48 horas de incubação com GW9508 na presença ou ausência de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 20 μ M de GW9508 (GW 20) ou 5 μ M de VAS2870 (VAS 5) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS 10) ou 20 μ M de GW9508 e 5 μ M de VAS2870 (GW VAS 5) ou 20 μ M de GW9508 e 10 μ M de VAS2870 (GW VAS 10) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Quatro a seis experimentos independentes com triplicatas entre as condições. Não houve diferença estatística entre as condições. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

5.8 Avaliação da apoptose após incubação com GW9508 na presença ou ausência de VAS2870 por 48 horas

Avaliamos a apoptose de células BRIN-BD11 após o tratamento com GW9508 na ausência ou presença de VAS2870. Utilizamos as duas concentrações de GW9508: 20 e 100 μ M. No entanto, as células expostas a 100 μ M de GW9508 na

presença de VAS2870 estavam aparentemente muito ruins: muitas células já soltas dos poços. Apresentamos apenas os resultados de 20 μ M de GW9508.

Os resultados estão divididos em: porcentagem de células viáveis (figura 19), porcentagem de células em apoptose (figura 20) e porcentagem de células mortas por apoptose (figura 21).

Figura 19 – Porcentagem de células viáveis após 48 horas de incubação com GW9508 na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 20 μ M de GW9508 (GW 20) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 20 μ M de GW9508 e 10 μ M de VAS2870 (GW 20 VAS) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Seis experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre as condições. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

Figura 20 – Porcentagem de células em apoptose após 48 horas de incubação com GW9508 na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 20 μ M de GW9508 (GW 20) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 20 μ M de GW9508 e 10 μ M de VAS2870 (GW 20 VAS) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Seis experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

Figura 21 – Porcentagem de células mortas após 48 horas de incubação com GW9508 na ausência ou presença de VAS2870

Células BRIN-BD11 foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 20 μ M de GW9508 (GW 20) ou 10 μ M de VAS2870 (VAS) ou 20 μ M de GW9508 e 10 μ M de VAS2870 (GW 20 VAS) em 11,1 mM de glicose por 48 horas. Seis experimentos independentes. Não houve diferença estatística entre as condições. One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

O GW9508 não provocou diferenças na viabilidade celular (figura 19) e nas células mortas (figura 21), mostrando que o GW9508 não apresenta toxicidade crônica. Na figura 20 notamos que a incubação de GW9508 na presença do inibidor da NADPH oxidase, VAS2870, promoveu uma diminuição estatisticamente significativa das células em apoptose (figura 20).

Nos experimentos com o GW9508 (conteúdo de superóxido e viabilidade celular) não observamos os efeitos obtidos anteriormente com o tratamento com ácido palmítico (aumento crônico de superóxido, diminuição de viabilidade celular e aumento de células em apoptose), sugerindo que a via do GPR40 não seja responsável pelos efeitos crônicos tóxicos do ácido palmítico em células beta pancreáticas.

5.9 Conteúdo e secreção de insulina após incubação com ácido palmítico por 48 horas

Nas próximas sessões descrevemos os primeiros experimentos em cultura de ilhotas pancreáticas de rato (secreção e conteúdo de insulina).

5.9.1 Secreção de insulina

Figura 22 – Secreção de insulina após 48 horas de incubação com ácido palmítico 5,6 ou 16,7 mM de glicose

Ilhotas isoladas de rato foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) em 5,6 ou 16,7 mM de glicose por 48 horas. Após o período de incubação, as ilhotas mantidas em 5,6 mM de glicose na cultura foram expostas agudamente a 5,6 mM (5,6 $\rightarrow$ 5,6) ou a 16,7 mM (5,6 $\rightarrow$ 16,7) e as ilhotas mantidas em 16,7 mM de glicose na cultura foram expostas agudamente a 5,6 mM (16,7 $\rightarrow$ 5,6) ou a 16,7 mM (16,7 $\rightarrow$ 16,7). Três experimentos independentes com duplicatas entre as condições. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

5.9.2 Conteúdo de insulina

Figura 23 – Conteúdo de insulina após 48 horas de incubação com ácido palmítico em 5,6 ou 16,7 mM de glicose

Ilhotas isoladas de rato foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de ácido palmítico (AP) em 5,6 ou 16,7 mM de glicose por 48 horas. Após o período de incubação, as ilhotas mantidas em 5,6 mM de glicose na cultura foram expostas agudamente a 5,6 mM (5,6 → 5,6) ou a 16,7 mM (5,6 → 16,7) e as ilhotas mantidas em 16,7 mM de glicose na cultura foram expostas agudamente a 5,6 mM (16,7 → 5,6) ou a 16,7 mM (16,7 → 16,7). Três experimentos independentes com duplicatas entre as condições. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Normalmente expressamos os dados de secreção de insulina através da razão secreção/conteúdo de insulina. Isso é possível porque agudamente o conteúdo de insulina não varia significativamente entre as condições, porém como cronicamente tivemos uma variação (figura 23), fizemos a divisão pelo número de ilhotas presentes no meio.

Nos experimentos de secreção de insulina (figura 22) em cultura de ilhotas pancreáticas de rato, as ilhotas responderam muito bem às variações na concentração de glicose e a exposição crônica a 16,7 mM de glicose levou a um aumento na secreção basal de insulina em relação a 5,6 mM de glicose.

O tratamento de 48 horas com ácido palmítico provocou diminuição no conteúdo de insulina das ilhotas em 16,7 mM de glicose (figura 23) e diminuição na secreção de insulina em alta concentração de glicose (figura 22).

A diminuição no conteúdo de insulina após o tratamento crônico com ácido palmítico em 16,7 mM de glicose (figura 23) pode ter ocorrido, por exemplo, por morte celular.

Os efeitos de diminuição na secreção e no conteúdo de insulina pelo ácido palmítico eram esperados, já que este ácido graxo é frequentemente relacionado à toxicidade em exposições crônicas, podendo suprimir a secreção de insulina e provocar disfunção da célula beta, fenômeno conhecido como lipotoxicidade (32-35).

Os efeitos tóxicos da exposição crônica ao ácido palmítico na secreção de insulina e na replicação celular podem estar relacionados a diversos mecanismos, tais como: (a) produção de ceramidas derivadas de ácidos graxos (38, 39); (b) estresse de retículo endoplasmático (40-43); (c) estimulação crônica do GPR40 (44-48); (d) geração de EROs por fontes mitocondriais e extra-mitocondriais, como a enzima NADPH oxidase, acompanhada pela redução da defesa antioxidante (35, 49), entre outros.

Os efeitos de redução no conteúdo e na secreção de insulina pelo ácido palmítico foram observados apenas em alta concentração de glicose. Esse protocolo simula a glicolipotoxicidade e deve existir um somatório dos efeitos de forma que a alta concentração de glicose deixa as ilhotas mais suscetíveis a um outro agressor e, portanto, a glicolipotoxicidade leva a uma diminuição na secreção e no conteúdo de insulina.

5.10 Conteúdo e secreção de insulina após incubação com GW9508 por 48 horas

5.10.1 Conteúdo de insulina

Avaliamos também o efeito do tratamento crônico com GW9508 na secreção e conteúdo de insulina (figuras 24 e 25).

Figura 24 – Conteúdo de insulina após 48 horas de incubação com GW9508 em 5,6 ou 16,7 mM de glicose

Ilhotas isoladas de rato foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de GW9508 (GW 100) em 5,6 ou 16,7 mM de glicose por 48 horas. Após o período de incubação, as ilhotas mantidas em 5,6 mM de glicose na cultura foram estimuladas agudamente em 5,6 mM (5,6 $\rightarrow$ 5,6) ou em 16,7 mM (5,6 $\rightarrow$ 16,7) e as ilhotas mantidas em 16,7 mM de glicose na cultura foram estimuladas agudamente em 5,6 mM (16,7 $\rightarrow$ 5,6) ou em 16,7 mM (16,7 $\rightarrow$ 16,7). Três experimentos independentes com duplicatas entre as condições. * $P < 0,05$ quando comparados com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

5.10.2 Secreção de insulina

Figura 25 – Secreção de insulina após 48 horas de incubação com GW9508 em 5,6 ou 16,7 mM de glicose

Ilhotas isoladas de rato foram incubadas na ausência (CTR) ou presença de 100 μ M de GW9508 (GW 100) em 5,6 ou 16,7 mM de glicose por 48 horas. Após o período de incubação, as ilhotas mantidas em 5,6 mM de glicose na cultura foram estimuladas agudamente em 5,6 mM (5,6 $\rightarrow$ 5,6) ou em 16,7 mM (5,6 $\rightarrow$ 16,7) e as ilhotas mantidas em 16,7 mM de glicose na cultura foram estimuladas agudamente em 5,6 mM (16,7 $\rightarrow$ 5,6) ou em 16,7 mM (16,7 $\rightarrow$ 16,7). Três experimentos independentes com duplicatas entre as condições. *** $P < 0,001$ quando comparados com o controle. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Os experimentos de secreção de insulina mostram que as ilhotas responderam muito bem às variações na concentração de glicose, porém 100 μ M de GW9508 provocaram diminuição no conteúdo de insulina das ilhotas após 48 horas de incubação em 16,7 mM de glicose (figura 24). Além disso, houve também diminuição na secreção de insulina em alta glicose (figura 25).

6 CONCLUSÕES

Em relação às células BRIN-BD11, nossos resultados mostram que o ácido palmítico apresenta toxicidade crônica relacionada à enzima NADPH oxidase. O ácido palmítico provocou um aumento no conteúdo de superóxido após 1 hora de incubação, que se estabiliza após 24 horas, mas volta a aumentar após 48 horas de incubação. O aumento crônico de superóxido está relacionado, pelo menos em parte, à produção desse radical pela enzima NADPH oxidase.

O tratamento com ácido palmítico provocou diminuição da viabilidade celular e aumento de células em apoptose. Tais efeitos tóxicos foram revertidos pela inibição da NADPH oxidase com VAS2870, mostrando que a enzima possui participação no desencadeamento da apoptose provocada pelo ácido palmítico.

Em relação ao estresse de retículo, observamos um aumento na expressão proteica de PERK fosforilado/PERK total após a incubação com ácido palmítico e a inibição da NADPH oxidase com VAS2870 provocou reversão parcial desse efeito. Como não obtivemos diferença estatística para os outros dois marcadores avaliados (elf2 α e CHOP-10), a participação da NADPH oxidase no estresse de retículo provocado pelo ácido palmítico ainda necessita de estudos mais aprofundados.

Quanto ao GW9508 (agonista do GPR40), os resultados mostram que 20 μ M de GW9508 provocaram diminuição do conteúdo de superóxido em 1 hora e 24 horas. Além disso, tal concentração não provocou diferenças na viabilidade celular e nas células em apoptose. A incubação de GW9508 na presença do inibidor da NADPH oxidase (VAS2870) promoveu diminuição significativa das células em apoptose.

Portanto, os resultados encontrados com GW9508 indicam que a estimulação crônica do receptor GPR40 não é responsável pelos efeitos tóxicos observados após o tratamento crônico com ácido palmítico.

Em relação à cultura de ilhotas de rato, os resultados ainda são preliminares. O ácido palmítico provocou redução no conteúdo e na secreção de insulina após 48 horas de exposição. Obtivemos os mesmos efeitos com 100 μ M de GW9508, concentração muitas vezes mais alta que as concentrações normalmente utilizadas em estudos agudos. Portanto, seria necessário repetir tais experimentos com 20 μ M de GW9508.

REFERÊNCIAS*

1. Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol.* 2000;11(4):267-75.
2. MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360(1464):2211-25.
3. Newsholme P, Gaudel C, McClenaghan NH. Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity. *Adv Exp Med Biol.* 2010;654:91-114.
4. Kunau WH, Dommes V, Schulz H. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res.* 1995;34(4):267-342.
5. Deeney JT, Gromada J, Høy M, Olsen HL, Rhodes CJ, Prentki M, et al. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *J Biol Chem.* 2000;275(13):9363-8.
6. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, et al. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest.* 1996;97(12):2728-35.
7. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 2003;422(6928):173-6.
8. Itoh Y, Hinuma S. GPR40, a free fatty acid receptor on pancreatic beta cells, regulates insulin secretion. *Hepatol Res.* 2005;33(2):171-3.
9. Gravena C, Mathias PC, Ashcroft SJ. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *J Endocrinol.* 2002;173(1):73-80.
10. Carpinelli AR, Picinato MC, Stevanato E, Oliveira HR, Curi R. Insulin secretion induced by palmitate--a process fully dependent on glucose concentration. *Diabetes Metab.* 2002;28(6 Pt 2):3S37-44; discussion 3S108-12.
11. Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, et al. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest.* 1997;100(2):398-403.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

12. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*. 2003;278(13):11303-11.
13. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005;11(1):90-4.
14. Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(1):97-104.
15. Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(2):406-10.
16. Kebede MA, Alquier T, Latour MG, Poitout V. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes Obes Metab*. 2009;11 Suppl 4:10-20.
17. Poitout V. The ins and outs of fatty acids on the pancreatic beta cell. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(5):201-3.
18. Gromada J. The free fatty acid receptor GPR40 generates excitement in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2006;147(2):672-3.
19. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*. 2006;55 Suppl 2:S16-23.
20. Del Guerra S, Bugliani M, D'Aleo V, Del Prato S, Boggi U, Mosca F, et al. G-protein-coupled receptor 40 (GPR40) expression and its regulation in human pancreatic islets: the role of type 2 diabetes and fatty acids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20(1):22-5.
21. Vettor R, Granzotto M, De Stefani D, Trevellin E, Rossato M, Farina MG, et al. Loss-of-function mutation of the GPR40 gene associates with abnormal stimulated insulin secretion by acting on intracellular calcium mobilization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3541-50.
22. Bharate SB, Rodge A, Joshi RK, Kaur J, Srinivasan S, Kumar SS, et al. Discovery of diacylphloroglucinols as a new class of GPR40 (FFAR1) agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(24):6357-61.
23. Christiansen E, Urban C, Merten N, Liebscher K, Karlsen KK, Hamacher A, et al. Discovery of potent and selective agonists for the free fatty acid receptor 1 (FFA(1)/GPR40), a potential target for the treatment of type II diabetes. *J Med Chem*. 2008;51(22):7061-4.
24. Garrido DM, Corbett DF, Dwornik KA, Goetz AS, Littleton TR, McKeown SC, et al. Synthesis and activity of small molecule GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(7):1840-5.

25. Briscoe CP, Peat AJ, McKeown SC, Corbett DF, Goetz AS, Littleton TR, et al. Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Br J Pharmacol.* 2006;148(5):619-28.
26. Negoro N, Sasaki S, Mikami S, Ito M, Suzuki M, Tsujihata Y, et al. Discovery of TAK-875: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable GPR40 Agonist. *ACS Medicinal Chemistry Letters.* 2010;1(6):290-4.
27. Houze JB, Zhu L, Sun Y, Akerman M, Qiu W, Zhang AJ, et al. AMG 837: a potent, orally bioavailable GPR40 agonist. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22(2):1267-70.
28. Araki T, Hirayama M, Hiroi S, Kaku K. GPR40-induced insulin secretion by the novel agonist TAK-875: first clinical findings in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14(3):271-8.
29. Sum CS, Tikhonova IG, Neumann S, Engel S, Raaka BM, Costanzi S, et al. Identification of residues important for agonist recognition and activation in GPR40. *J Biol Chem.* 2007;282(40):29248-55.
30. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr.* 2006;136(4):873-6.
31. Wang Y, Wang PY, Takashi K. Chronic effects of different non-esterified fatty acids on pancreatic islets of rats. *Endocrine.* 2006;29(1):169-73.
32. Maris M, Robert S, Waelkens E, Derua R, Hernangomez MH, D'Hertog W, et al. Role of the saturated nonesterified Fatty Acid palmitate in Beta cell dysfunction. *J Proteome Res.* 2013;12(1):347-62.
33. Dixon G, Nolan J, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P. Arachidonic acid, palmitic acid and glucose are important for the modulation of clonal pancreatic beta-cell insulin secretion, growth and functional integrity. *Clin Sci (Lond).* 2004;106(2):191-9.
34. El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology.* 2003;144(9):4154-63.
35. Gehrmann W, Elsner M, Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12 Suppl 2:149-58.
36. Keane DC, Takahashi HK, Dhayal S, Morgan NG, Curi R, Newsholme P. Arachidonic acid actions on functional integrity and attenuation of the negative effects of palmitic acid in a clonal pancreatic β -cell line. *Clin Sci (Lond).* 2011;120(5):195-206.

37. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*. 2003;52(3):726-33.
38. Kelpe CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V. Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *J Biol Chem*. 2003;278(32):30015-21.
39. Lang F, Ullrich S, Gulbins E. Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(9):1061-71.
40. Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology*. 2006;147(7):3398-407.
41. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):E275-81.
42. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazzarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 14):2308-18.
43. Cnop M, Ladrière L, Igoillo-Esteve M, Moura RF, Cunha DA. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β -cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12 Suppl 2:76-82.
44. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab*. 2005;1(4):245-58.
45. Tan CP, Feng Y, Zhou YP, Eiermann GJ, Petrov A, Zhou C, et al. Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes*. 2008;57(8):2211-9.
46. Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Ogi K, Tanaka H, et al. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes*. 2009;58(5):1067-76.
47. Zhang X, Yan G, Li Y, Zhu W, Wang H. DC260126, a small-molecule antagonist of GPR40, improves insulin tolerance but not glucose tolerance in obese Zucker rats. *Biomed Pharmacother*. 2010;64(9):647-51.
48. Wu J, Sun P, Zhang X, Liu H, Jiang H, Zhu W, et al. Inhibition of GPR40 protects MIN6 β cells from palmitate-induced ER stress and apoptosis. *J Cell Biochem*. 2012;113(4):1152-8.

49. Michalska M, Wolf G, Walther R, Newsholme P. Effects of pharmacological inhibition of NADPH oxidase or iNOS on pro-inflammatory cytokine, palmitic acid or H₂O₂-induced mouse islet or clonal pancreatic β -cell dysfunction. *Biosci Rep*. 2010;30(6):445-53.
50. Veluthakal R, Palanivel R, Zhao Y, McDonald P, Gruber S, Kowluru A. Ceramide induces mitochondrial abnormalities in insulin-secreting INS-1 cells: potential mechanisms underlying ceramide-mediated metabolic dysfunction of the beta cell. *Apoptosis*. 2005;10(4):841-50.
51. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes*. 2001;50(1):69-76.
52. Koeppen BM, Stanton BA. *Berne & Levy Fisiologia*. 6. ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2009.
53. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*. 2002;7(4):335-45.
54. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.
55. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*. 2007;583(Pt 1):9-24.
56. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93(5):1464-76.
57. Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. *Diabetes*. 2003;52(6):1457-63.
58. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, et al. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia*. 2007;50(2):359-69.
59. Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F, Graciano MF, Oliveira-Emilio HR, Hirata AE, et al. Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2009;150(5):2197-201.
60. Rebelato E, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR. Low doses of hydrogen peroxide impair glucose-stimulated insulin secretion via inhibition of glucose metabolism and intracellular calcium oscillations. *Metabolism*. 2010;59(3):409-13.
61. Graciano MF, Santos LR, Curi R, Carpinelli AR. NAD(P)H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets. *J Cell Physiol*. 2011;226(4):1110-7.

- 62.Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:106507.
- 63.O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J.* 1993;290 (Pt 1):41-9.
- 64.Tegtmeier F, Walter U, Schinzel R, Wingler K, Scheurer P, Schmidt HHW, inventorsCompounds containing a N-heteroaryl moiety linked to fused ring moieties for the inhibition of NAD(P)H oxidases and platelet activation2005.
- 65.Stielow C, Catar RA, Muller G, Wingler K, Scheurer P, Schmidt HH, et al. Novel Nox inhibitor of oxLDL-induced reactive oxygen species formation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(1):200-5.
- 66.ten Freyhaus H, Huntgeburth M, Wingler K, Schnitker J, Bäumer AT, Vantler M, et al. Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):331-41.
- 67.Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3378-89.
- 68.Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, et al. Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. *Cell Metab.* 2009;10(1):13-26.
- 69.Li J, Zhu H, Shen E, Wan L, Arnold JM, Peng T. Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2010;59(8):2033-42.
- 70.Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol.* 2010;191(6):1113-25.
- 71.Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 1967;16(1):35-9.
- 72.Oliveira HR, Curi R, Carpinelli AR. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Physiol.* 1999;276(2 Pt 1):C507-10.
- 73.Rebelato E, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR. Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism. *PLoS One.* 2011;6(8):e24507.
- 74.Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol.* 2010;191(6):1113-25.

75. Zhao Y, Wang L, Qiu J, Zha D, Sun Q, Chen C. Linoleic acid stimulates $[Ca^{2+}]_i$ increase in rat pancreatic beta-cells through both membrane receptor- and intracellular metabolite-mediated pathways. PLoS One. 2013;8(4):e60255.

APÊNDICE A - Testes de diferentes meios de incubação

A maioria dos experimentos realizados no nosso laboratório utiliza como meio de incubação o tampão Krebs Henseleit, que é um meio pobre em nutrientes. Isso ocorre porque estes experimentos têm como objetivo a avaliação de tratamentos agudos (1 hora) de células beta pancreáticas. Neste projeto, porém avaliamos tanto a estimulação aguda, quanto crônica destas células e, portanto, tivemos que utilizar um meio de cultura que contivesse nutrientes suficientes para manutenção celular durante todo o período de incubação.

Em nosso laboratório, os experimentos realizados com a linhagem de célula beta INS-1E são feitos em meio RPMI acrescido de 1% de SFB e 1% de albumina livre de ácidos graxos (ALAG). Como o SFB possui pequenas quantidades não especificadas de ácidos graxos, a utilização de baixa concentração de SFB é interessante, pois reduz a quantidade desconhecida de ácidos graxos. Fizemos alguns testes a fim de verificar se esse meio também é adequado para a linhagem BRIN-BD11.

Em dois experimentos independentes, as células BRIN-BD11 foram mantidas até 72 horas em placas de 24 poços com 500 μ l de meio RPMI com 1% de SFB e 1% de ALAG. Após 48 horas e 72 horas, praticamente todas as células já estavam soltas dos poços.

Em outros dois experimentos independentes, testamos diferentes volumes de incubação: 500 μ l, 600 μ l, 700 μ l, 800 μ l, 900 μ l e 1000 μ l. Para cada volume de incubação com meio RPMI 1% SFB e 1% ALAG, fizemos um respectivo controle com meio RPMI 10% SFB. Mais uma vez, as células que foram incubadas na presença de RPMI 1% SFB e 1% ALAG morreram, mas todas as células incubadas na presença de RPMI 10% SFB sobreviveram.

Portanto, mesmo que o meio com 10% de SFB possua uma pequena quantidade desconhecida de ácidos graxos, se mostrou o mais apropriado para a linhagem BRIN-BD11, principalmente para períodos crônicos de incubação. A fim de manter a homogeneidade dos resultados, todos os experimentos realizados posteriormente, tanto agudos quanto crônicos, foram realizados em meio RPMI com 10% de SFB.

APÊNDICE B - Testes de concentração de DHE

Todos os experimentos com DHE realizados no nosso laboratório até então foram feitos em tampão Krebs Henseleit sem albumina. No entanto, por mantermos as células BRIN-BD11 em meio RPMI com 10% de SFB, houve a necessidade de nova padronização para análise de conteúdo de superóxido pelo método de fluorescência com DHE.

A concentração de DHE testada inicialmente (5 μM) é a concentração utilizada por nosso grupo em experimentos realizados em Krebs Henseleit sem albumina na linhagem BRIN-BD11. Foram realizados seis experimentos independentes com triplicatas entre as condições e em todos os experimentos, os picos de fluorescência de todas as amostras estavam sobrepostos com o pico de auto-fluorescência da célula, prejudicando a análise do experimento, já que a auto-fluorescência deve ser descontada do valor obtido em cada condição.

Nos experimentos seguintes, foram testadas 18, 21, 23 ou 25 μM de DHE (dois experimentos independentes com triplicatas entre as condições), mas ainda assim, os picos de fluorescência de todas as amostras estavam na auto-fluorescência. A concentração de DHE foi, então, elevada para 30, 40 e 50 μM (três experimentos independentes com triplicatas entre as condições). Os picos de fluorescência das amostras ficaram fora da auto-fluorescência e os resultados estão apresentados na figura 1A.

Figura 1A – Testes de concentração de DHE

Conteúdo de superóxido em células BRIN-BD11 após incubação por 1 hora em diferentes concentrações de glicose (5,6, 11,1 ou 16,7 mM). Foram testadas diferentes concentrações de DHE (30 μM, 40 μM ou 50 μM). Três experimentos independentes com triplicatas entre as condições. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controle 5,6 mM de glicose. Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Através da análise da figura 1A, observamos uma queda no conteúdo de superóxido com o aumento da concentração de glicose. Tal resultado já era esperado, já que com o aumento da concentração de glicose há concomitantemente um aumento na defesa antioxidante da célula beta (72, 73).

Ainda na figura 1A, observamos que em todas as concentrações de DHE utilizadas (30 μM, 40 μM e 50 μM) obtivemos diferença significativa entre 5,6 e 16,7 mM de glicose: $p < 0,01$ para 30 μM e $p < 0,001$ para 40 e 50 μM. Acreditamos que as concentrações de 40 μM e 50 μM de DHE sejam as mais adequadas por apresentarem melhor sensibilidade entre as diferentes concentrações de glicose. Decidimos, portanto, escolher a menor delas, 40 μM para os experimentos realizados posteriormente.