GABRIELA NUNES MARSIGLIO LIBRAIS

PARTICIPAÇÃO DO GPR40 NA ATIVAÇÃO DA NADPH OXIDASE NA LINHAGEM CELULAR BRIN-BD11

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

São Paulo

2014

GABRIELA NUNES MARSIGLIO LIBRAIS

PARTICIPAÇÃO DO GPR40 NA ATIVAÇÃO DA NADPH OXIDASE NA LINHAGEM CELULAR BRIN-BD11

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Versão original

São Paulo

2014

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

Librais, Gabriela Nunes Marsiglio.
Participação do GPR40 na ativação da enzima NADPH oxidase na linhagem celular BRIN-BD11 / Gabriela Nunes Marsiglio Librais. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli.

Tese (Doutorado) – 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: Participation of GPR-40 receptor in the NADPH oxidase activation in BRIN-BD11 cell line.

1. Células BRIN-BD11 2. GPR40 3. NADPH oxidase 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/SBIB098/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriela Nunes Marsiglio Librais.

Título da Tese: Participação do GPR40 na ativação da enzima NADPH oxidase na linhagem celular BRIN-BD11.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **354/10** referente ao projeto intitulado: ***"Participação da enzima NAD(P)H oxidase e do receptor GPR-40 no processo de secreção de insulina na linhagem celular BRIN-BD 11"*** sob a responsabilidade de **Gabriela Nunes Marsiglio,** 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, 25 de fevereiro de 2010.

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

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

Dedico este trabalho aos maiores incentivadores do meu crescimento pessoal e profissional, Fabrício e Christina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro que fez possível a realização desse trabalho junto a Universidade de São Paulo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli, por me abrir as portas do seu laboratório, por confiar no meu potencial, disponibilizar seu tempo e ensinamentos para que eu realizasse esse projeto de pesquisa.

A Deus por renovar minha força e esperança todos os dias.

Ao meu marido Fabrício, pelos momentos de dedicação, companheirismo, compreensão, encorajamento e credibilidade. Você é a pessoa que faz diferença em minha vida.

A minha mamãe Christina pela luta desmedida em dar-me oportunidades e estudo. Minha amiga e companheira de toda a hora, tudo o que conquistei foi devido aos seus incentivos, amor, cuidado e dedicação.

Ao vovô Renato e vovó Haydée (em memória) por terem sonhado com esse Título. Vocês foram meus concretos incentivadores a leitura. Foi com vocês que aprendi que é admirável ser erudito.

Agradeço aos amigos Eduardo Rebelato, Letícia Roma e Maria Fernanda, companheiros de laboratório que disponibilizaram seu tempo e conhecimento e que contribuíram substancialmente com meu crescimento profissional.

À Marlene Rocha, técnica do laboratório de fisiologia da secreção de Insulina, pela amizade, grande apoio no decorrer dos experimentos, ensinamentos e horas agradáveis de convivência.

Aos colegas de laboratório pelo aprazível tempo em que trabalhamos juntos, amizade e apoio.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)

RESUMO

MARSIGLIO-LIBRAIS, G. N. **Participação do GPR40 na ativação da enzima NADPH oxidase na linhagem celular BRIN-BD11**.2014. 72 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Linhagens secretoras de insulina, tal como a BRIN-BD11, são utilizadas como ferramenta para o estudo do mecanismo de secreção de insulina estimulado pela glicose (GSIS). Essas células expressam o receptor GPR40, que quando ativado por ácidos graxos, potencializam a GSIS. Considerando que as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem estar relacionadas com a secreção de insulina mediada por ácidos graxos, este estudo tem como foco avaliar se há envolvimento do GPR40 na GSIS e na produção de EROs, via NADPH oxidase, em células BRIN-DB11. Para ativação do receptor GPR40 foi utilizado o agonista farmacológico GW9508. A presença da enzima NADPH oxidase nas células BRIN-BD11 foi investigada via Western Blotting e PCR em tempo real das subunidades $p22^{phox}$, $gp91^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e $p47^{phox}$. A secreção de insulina e o conteúdo de superóxido (CS) foram analisados em resposta a concentrações crescentes de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1; 16,7 e 20,0 mM) na presença ou ausência de GW9508 (20 µM). Como forma de aferir a ativação da enzima NADPH oxidase com estímulo de GW9508, a translocação da subunidade $p47^{phox}$ e $p40^{phox}$, do citoplasma para a membrana plasmática, foram avaliadas por Western Blotting após fracionamento celular. Adicionalmente, o envolvimento da NADPH oxidase no CS induzido pelo GW9508 (20 µM) foi analisado após inibição da enzima NADPH oxidase pelo fármaco VAS2870 (12 µM) ou pela técnica de interferência por RNA (RNAi), utilizando RNAi para a subunidade $p22^{phox}$ da NADPH oxidase (RNAi-$p22^{phox}$). As células BRIN-BD11 expressam a enzima NADPH oxidase. O aumento da concentração de glicose paralela com aumento substancial da secreção de insulina, causa redução no CS dessas células. Entretanto, a presença do GW9508 potencializa a secreção de insulina em altas concentrações de glicose (16,7 mM e 20,0 mM) em torno de 41% e 43%, respectivamente, juntamente com aumento no CS. Esse aumento do CS causado por estimulação com GW9508 foi paralelo com aumento da translocação da subunidade $p47^{phox}$ do plasma para a membrana. Com a inibição da NADPH oxidase o efeito do GW9508 não ocorreu, sugerindo que há uma correlação entre a ativação do GPR40 e a atividade da NADPH oxidase nas células secretoras de insulina BRIN-BD11.Os dados confirmam um efeito positivo do GPR40/120 na secreção de insulina estimulada pela glicose. Adicionalmente, o GW9508 ativa a NADPH oxidase resultando em um aumento do conteúdo de superóxido nas células BRIN-BD11.

Palavras-chave: BRIN-BD11. GPR40. NADPH oxidase.

ABSTRACT

MARSIGLIO-LIBRAIS, G. N. **Participation of GPR-40 receptor in the NADPH oxidase activation in BRIN-BD11 cell line.** 2014. 72 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Insulin secreting cell lines such as BRIN-BD11 are currently used to study the mechanisms of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). BRIN-BD11 cells express the GPR-40 receptor, which is activated by fatty acids and potentiates GSIS. Considering that reactive oxygen species is a signal that modulates insulin secretion induced by fatty acids, this study aimed to investigate the involvement of GPR-40 in ROS production, via NADPH oxidase, and in GSIS in BRIN-BD11 cells.To specifically activate the GPR-40 receptor its pharmacological agonist, GW9508, was used. Gene and protein expression of NADPH oxidase subunits ($p22^{phox}$, $gp91^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e $p47^{phox}$) were investigated by Western Blotting and qPCR. Insulin secretion and superoxide production were analyzed in response to increasing glucose concentrations, at the absence or the presence of GW9508 (20 µM). To confirm the activation of NADPH oxidase by GW9508 (20 µM), the translocation of $p47^{phox}$ and $p40^{phox}$ subunits to the plasma membrane was analyzed by western blotting after cell fractioning. Additionally, the involvement of NADPH oxidase on superoxide production induced by GW9508 (20 µM) was also evaluated using a small interference RNA against the NADPH oxidase subunit $p22^{phox}$ (siRNA-$p22^{phox}$) or using the NADPH oxidase pharmacological inhibitor, VAS2870 (12 µM). BRIN-BD11 cells express all the NADPH oxidase subunits. Interestingly, increasing glucose concentrations paralleled to a substantial stimulation in insulin secretion caused a reduction in the BRIN-BD11 superoxide content. However, the presence of GW9508 potentiated the insulin secretion at high glucose concentrations (16.7 mM and 20.0 mM) by 41% and 43%, respectively, together with an increased effect on superoxide content. This increase in superoxide content caused by GW9508 was paralleled by an increase in the translocation of $p47^{phox}$ subunit to the plasma membrane. Moreover, the inhibition of NADPH oxidase abolished the GW9508 effect, showing a correlation between the activation of GPR40 receptor and the NADPH oxidase activity on BRIN-BD11 insulin secreting cells. Our results show a positive effect of the GPR40/120 activation in glucose-stimulated insulin secretion. Additionally, GW9508 activates NADPH oxidase resulting in an increase in the superoxide content in BRIN-BD11 cells.

Keywords: BRIN-BD11. GPR-40. NADPH oxidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do GW9508, agonista do receptor de membrana GPR40. 21

Figura 2. Expressão proteica e gênica do GPR40 em células BRIN-BD11.....22

Figura 3. Teste de concentração de GW9508 a ser utilizado em células BRIN-BD11. 40

Figura 4. Efeito do GW9508 na secreção de insulina dependente de glicose de células BRIN-BD11. 41

Figura 5. Expressão gênica dos componentes da enzima NADPH oxidase em células BRIN-BD11.....42

Figura 6. Expressão proteica dos componentes da NADPH oxidase em células BRIN-BD11 e Ilhotas de Langherans de ratos Wistar como controle positivo.....43

Figura 7. Conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 após estímulo de 60 minutos em diferentes concentrações de glicose.....44

Figura 8. Curva de conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 pós-estímulo de 60 minutos em diferentes concentrações de glicose, na ausência (○) ou presença (●) de GW9508 45

Figura 9. Análise quantitativa da proteína $p47^{phox}$ em fração citosólica e de membrana quando expostas ao GW9508 (20 µM), no tempo indicado (A).....46

Figura 10. Análise quantitativa da proteína $p40^{phox}$ em fração citosólica e de membrana quando expostas ao GW9508 (20 µM), no tempo indicado (A).....47

Figura 11. Viabilidade celular de células BRIN-BD11 transfectadas com RNAc (■) e RNAi-$p22^{phox}$ (▲).....48

Figura 12. Expressão proteica da subunidade da NADPH oxidase, $p22^{phox}$, em células controle (C), com lipossomos (L) e transfectadas com RNAc ou RNAi-$p22^{phox}$ na presença de lipossomos.....49

Figura 13. Conteúdo de superóxido em células BRIN-BD11 transfectadas com RNAc ou RNAi-$p22^{phox}$ após estímulo de 60 minutos em diferentes concentrações de glicose 50

Figura 14. Conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 transfectadas com RNAc ou RNAi-p22^{phox}, pós-estímulo de 60 minutos em diferentes concentrações de glicose, na ausência ou presença de GW9508 (20 µM) 51

Figura 15. Efeito do GW9508 (20 µM) e VAS2870 (12 µM) no conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

1.1 Pâncreas endócrino 15

1.2 Mecanismo de secreção de insulina 17

1.3 Proteína de membrana GPR40 19

1.4 Linhagem celular BRIN-BD11 22

1.5 Enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (NADPH oxidase) 23

1.5.1 Espécies reativas de oxigênio 24

1.6 Proteínas quinases 26

2 JUSTIFICATIVA 29

3 OBJETIVO 30

4 MATERIAL E MÉTODOS 31

4.1 Cultura de células BRIN-BD11 31

4.2 Cultura das células BRIN-BD11 com RNA de interferência para proteína p22^{phox} 31

4.2.1 Estudo da viabilidade celular após o tratamento de células BRIN-BD11 com RNAi-p22^{phox} 31

4.3 Expressão gênica dos componentes da enzima NADPH oxidase em células BRIN-BD11 por PCR em tempo real 32

4.4 Western Blotting de células BRIN-DB11 33

4.4.1 Western Blotting para análise de expressão proteica dos componentes da enzima NADPH oxidase 33

4.4.2 Western Blotting para análise de eficiência de transfecção com RNAi-p22^{phox} 34

4.4.3 Western Blotting para análise de fração proteica de citoplasma e de membrana plasmática de p40^{phox} e p47^{phox} 35

4.5 Secreção estática de insulina de células BRIN-BD11 36

4.5.1 Secreção estática de insulina.....36

4.5.2 Dosagem de insulina.....36

4.6 Análise do conteúdo de ânion superóxido de células BRIN-BD11 37

4.6.1 Estímulo de glicose.....37

4.6.2 Estímulo de glicose com GW9508.....38

4.6.3 Estímulo de glicose com VAS2870 e/ou GW9508.....38

5 RESULTADOS 39

5.1 Avaliação da secreção de insulina em células BRIN-BD11, em diferentes concentrações de glicose, na presença ou ausência do agonista farmacológico do receptor GPR40, GW9508.....39

5.1.1 Secreção estática de insulina.....39

5.2 Avaliação da expressão gênica e proteica dos componentes da enzima NADPH oxidase em células BRIN-BD11.....41

5.3 Avaliação do conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11.....43

5.3.1 Caracterização do conteúdo de superóxido após estímulo agudo de glicose.....43

5.3.2 Caracterização do conteúdo de superóxido após estímulo agudo de glicose na presença ou ausência de GW9805.....44

5.4 Translocação das proteínas citoplasmática da NADPH oxidase p47^{phox} e p40^{phox} quando estimuladas com GW9508 45

5.5 Knockdown da subunidade p22^{phox} da NADPH oxidase pela técnica de RNA de interferência em células BRIN-BD11.....48

5.5.1 Viabilidade celular após o tratamento com RNAi-p22^{phox} 48

5.5.2 Expressão proteica da subunidade p22^{phox} 48

5.5.3 Conteúdo de superóxido em diferentes concentrações de glicose.....49

5.5.4 Conteúdo de superóxido de células transfectadas com RNAi-p22^{phox} na presença ou ausência de GW9508.....50

5.6 Conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 incubadas com inibidor farmacológico da enzima NADPH oxidase, VAS2870, na presença e ausência de GW9508 51

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 53

7 CONCLUSÃO 57

REFERÊNCIAS 58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pâncreas endócrino

O pâncreas é um órgão anfícrino por possuir combinação de estruturas endócrinas e exócrinas. O tecido pancreático exócrino é constituído por células acinares e a secreção endócrina é realizada pelas ilhotas pancreáticas, que estão dispersas entre os ácinos (1).

As ilhotas pancreáticas são formadas por diferentes tipos celulares: (I) as células A ou α, compõem aproximadamente 26% das células da ilhota e são responsáveis pela síntese e secreção do hormônio glucagon; (II) as células B ou β, compõem aproximadamente 64% das células da ilhota e são responsáveis pela síntese e secreção do hormônio insulina; (III) as células D ou δ, compõem em torno de 8% das células da ilhota e são produtoras de somatostatina; e (IV) as células F ou PP, ocupam em torno de 0,3% da ilhota e são produtoras de polipeptídio pancreático (1). Entre os diferentes tipos celulares encontrados na ilhota, existe uma estreita relação por meio de comunicação parácrina que permite interferir na secreção hormonal das células adjacentes. Assim o que é produzido a partir de um determinado tipo celular tem efeitos sobre os outros tipos de células da ilhota. Podemos citar como exemplo, a somatostatina inibindo a secreção de insulina, enquanto a insulina e a somatostatina inibem a secreção do glucagon (2).

A localização estratégica das ilhotas no órgão permite que os hormônios secretados sejam lançados diretamente na veia porta-hepática favorecendo o controle direto da função hepática (3). Acredita-se que poderia ter havido um sistema vascular que permitisse a nutrição dos ácinos por hormônios endócrinos e que isso pode ter sido importante em algum estágio evolutivo o que explicaria a localização das ilhotas entre os lóbulos acinares (4). As ilhotas são ricamente vascularizadas por fluxo sanguíneo arteriolar. Estudos realizados na década de 80 com microesferas mostraram que as ilhotas representam 1% da massa do pâncreas de coelhos e recebem pelo menos 10% do fluxo sanguíneo pancreático (3, 5). Pequenas arteríolas vascularizam o centro da ilhota através de descontinuidades ou poros do tecido endotelial, em seguida, convergem em uma rede de capilares fenestrados que

se aglutinam em vênulas coletoras antes ou depois de sair da ilhota (6). Este arranjo cria um sistema capaz de transportar altas concentrações de hormônios (3). Em seres humanos, as ilhotas de Langherans, tomadas em conjunto, ocupam de dois a três por cento do pâncreas, a quantidade é em torno de um milhão de ilhotas, porém o número total de ilhotas depende da idade, tamanho do pâncreas, índice de massa corporal e outras condições como por exemplo a gravidez (7). Cada ilhota apresenta em torno de 2500 células, no entanto, algumas podem conter apenas poucas células, enquanto outras podem conter até 12 mil células (3). O diâmetro de uma ilhota pode variar de 50 – 250 µm (8), porém a maioria presente no pâncreas está entre 50 – 100 µm (9).

A insulina foi descoberta em 1921, e a partir daí até 1960, pacientes diabéticos do Tipo I tiveram aumento da expectativa de vida e pesquisadores e médicos passaram a melhor identificar as síndromes decorrentes de complicações do diabetes, havendo significante melhoria do tratamento dessas complicações (10).

Por ser um hormônio peptídico, a insulina produz seus efeitos por ligar-se aos receptores de insulina (IR) na membrana plasmática das células-alvo, desencadeando a ativação de vias de transdução de sinais intracelulares (11). Praticamente todos os tecidos de vertebrados possuem receptores para o hormônio insulina, mas o que caracteriza um órgão possuir maior ou menor sensibilidade ao hormônio é a quantidade de receptores presentes na membrana de suas células. Assim, os eritrócitos possuem algumas dezenas de receptores enquanto que adipócitos, hepatócitos e células musculares apresentam milhares destes e, dessa forma, são mais sensíveis às ações da insulina (14).

O receptor de insulina faz parte da família de receptores tirosina quinase. Trata-se de uma glicoproteína heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$), composta de duas subunidades α e duas β unidas por duas pontes dissulfeto. As subunidades α são extracelulares e contêm sítios de ligação para a insulina, e as subunidades β, transmembranas, são enzimas alostéricas que possui atividade tirosina quinase em seu domínio citosólico (11, 12). Após a ligação da insulina no sítio das subunidades α, ocorre uma dimerização do receptor para formar o complexo $\alpha_2\beta_2$, o que leva ao primeiro passo da ativação do receptor, que é a trans-autofosforilação dos resíduos de tirosina Tyr^{1158}, Tyr^{1162} e Tyr^{1163} localizados na porção citoplasmática das subunidades β (12, 13). Esses pontos fosforilados atuam como ponto de ancoragem

para outros substratos, como a classe de moléculas chamadas de substratos do receptor de insulina (IRS), a partir de então o sinal é propagado, dando continuidade ao mecanismo de transdução de sinal da insulina (11).

1.2 Mecanismo de secreção de insulina

Na célula B pancreática a insulina é sintetizada na forma de uma única cadeia polipeptídica inativa chamada de pré-pró-insulina. Essa cadeia possui em sua porção N-terminal uma sequência de sinalização que quando clivada por proteases, dá a conformação molecular da pró-insulina com a formação de duas pontes de dissulfeto. Esta última é, então, direcionada ao complexo de *Golgi* onde é armazenada em vesículas. Dentro das vesículas a pró-insulina sofre ação de enzimas pró-hormônio convertases 1, 2 e 3 que causam a hidrólise de duas ligações peptídicas, dando origem ao peptídeo C e à conformação molecular final da insulina: duas cadeias polipeptídicas unidas por 2 pontes dissulfeto, com um total de 51 resíduos de aminoácidos (21 na cadeia A e 30 na cadeia B) e peso molecular de 5.733Da (14). As vesículas migram para as proximidades da membrana plasmática e, dependendo do estímulo, a insulina é secretada pelo processo de exocitose.

A secreção de insulina pelas células B pancreáticas é modulada por hormônios peptídicos, neurotransmissores e uma variedade de nutrientes (15). Durante o processo de absorção intestinal dos nutrientes, alguns hormônios secretados pelo epitélio intestinal como GIP (*glucose insulinotropc peptide*), colecistocinina (16) e GLP-1 (*glucagon like peptide-1*) (17) potencializam a secreção de insulina. Entretanto, os nutrientes necessitam ser metabolizados no interior das células B pancreáticas para ativarem o mecanismo de secreção. Dentre os nutrientes metabolizáveis pela célula B estão os aminoácidos, ácidos graxos e glicose, sendo este último o principal secretagogo do hormônio (18-20).

A glicose é transportada para o interior da célula B por difusão facilitada via Transportador de Glicose do Tipo 2 (GLUT-2) e, uma vez no interior das células B, é fosforilada a glicose-6-fosfato principalmente pela enzima glicoquinase (19), tornando-se impermeável à membrana plasmática. A glicoquinase é uma enzima presente em células hepáticas e pancreáticas que possui alta especificidade para a

molécula de glicose e funciona como reguladora do fluxo glicolítico, exercendo papel regulador da concentração de glicose no interior das células B. Na célula B, a maior parte das moléculas de glicose-6-fosfato é destinada a glicólise, levando à formação de piruvato que, por sua vez, é transportado para a mitocôndria, onde é convertido em acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase. As moléculas de acetil-CoA geradas na glicólise são metabolizadas no ciclo de Krebs, promovendo aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo ($FADH_2$) em suas formas reduzidas. Essas moléculas são ricas em energia por carregarem elétrons com alto potencial de transferência e, durante a fosforilação oxidativa, liberam grande quantidade de energia utilizada na geração de ATP. Assim, a relação ATP/ADP aumenta no citosol das células B (19) levando ao fechamento dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) com subsequentemente despolarização da membrana plasmática e abertura de canais para cálcio sensíveis à voltagem (CCSV). O aumento do influxo de cálcio para a célula B desencadeia o processo de exocitose dos grânulos que contém insulina e gera uma despolarização suplementar da membrana plasmática (21).

Embora a glicose seja o principal estímulo para a secreção de insulina pelas células B das ilhotas pancreáticas (22-24), os ácidos graxos livres (AGL) também são capazes de modular a secreção de insulina na presença de glicose (25-28). Classicamente, se conceitua que os AGL modulam o processo de secreção de insulina por meio de sua conversão em acil-coenzima A (acil-CoA) pela enzima acil-CoA sintetase. Em condições basais de glicose, a molécula de acil-CoA de cadeia longa (LC-CoA) é beta oxidada na mitocôndria promovendo reposição de moléculas intermediárias ao ciclo de Krebs levando ao aumento da razão ATP/ADP. No entanto, na presença de elevadas concentrações de glicose, o metabolismo dos AGL pode resultar no aumento de citrato e consequente acúmulo de malonil-CoA, que por sua vez inibe a enzima *carnitina pamitil transferase I* (CPT-1), responsável por transportar a LC-CoA através da membrana mitocondrial externa iniciando o primeiro passo para beta-oxidação. A inibição do processo de metabolização dos AGL proporciona aumento na concentração de LC-CoA citoplasmático, que agudamente, potencializa a secreção de insulina induzida pela glicose por se complexar aos α-glicerofosfatos, formando moléculas de DAG, que ativam a PKC, que por sua vez estão envolvidos na extrusão dos grânulos de insulina (29, 30).

1.3 Proteína de membrana GPR40

Além de sua metabolização, os ácidos graxos podem funcionar como sinalizadores extracelulares por se ligarem a receptores de membranas acoplados a proteínas G (31, 32). Dentre eles, o GPR40 que possui como principais ligantes o ácido linoleico e o ácido oleico (33), é expresso principalmente por células B e linhagens celulares secretoras de insulina. É ativado por ácidos graxos de cadeia média e longa (34) podendo, estes últimos, serem saturados ou insaturados (26, 31, 35).

O ácido oleico, em ativando o GPR40 provoca aumento do influxo de cálcio na presença de concentrações mais elevadas de glicose (8,3 e 11,1 mM). Em baixas concentrações de glicose (5,6 mM), não é observado esse efeito, sugerindo que no jejum, quando a concentração de AGL circulante está alta e a concentração de glicose está baixa, os ácidos graxos não aumentam a secreção de insulina o que levaria à hipoglicemia (33). Em células INS-1E a inibição do GPR40 resultou em uma diminuição na capacidade do ácido palmítico em aumentar a concentração do cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ e diminuiu a potencialização da secreção de insulina (34). Em células MIN6 essa supressão eliminou o aumento da secreção estimulada pelo ácido linoleico e γ-linolênico (35). Em células MIN6, o ácido linoleico aumenta a secreção de insulina estimulada pela glicose e o GW1100, antagonista seletivo para GPR40, inibe apenas parcialmente a secreção estimulada por esse ácido graxo (36).

A ligação do ácido graxo ao GPR40 ativa a proteína G heterotrimérica, que contém a subunidade α da família Gq ($G_{\alpha q}$), que leva à ativação da fosfolipase C (PLC) (37-39). A ativação da PLC induz a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato dando origem ao DAG e IP_3 que levam, respectivamente, à ativação da PKC e à mobilização do cálcio do retículo endoplasmático (RE) (40). No entanto, a ativação de PKC e a mobilização do cálcio do RE como sendo as principais rotas de sinalização do GPR40, são controversas. Há dados na literatura mostrando que o ácido oleico aumenta a produção de inositol fosfato (IP) intracelular (metabólito de IP_3) de forma dependente da concentração do ácido graxo (41), porém outros estudos apontam que ativação do GPR40 e, consequentemente, a via $G_{\alpha q}$-PLC, por esse ácido graxo, está relacionado com a principal fonte de aumento da $[Ca^{2+}]_i$ por

ativação dos canais de Ca^{2+} do tipo-L da membrana plasmática das células B isoladas (33).

Estudos em cardiomiócitos apontam que o DAG, em resposta à estimulação, de $G_{\alpha q/11}$, liga-se ao domínio C1 da PKD1 gerando uma sequência de fosforilações da molécula de PKD1 promovendo a ativação da quinase catalítica, bem como a sua translocação para a membrana plasmática (42). Essa descoberta intrigou pesquisadores que passaram a investigar a sinalização em resposta à estimulação do GPR40 em células secretoras de insulina. Os resultados obtidos sugeriram que o DAG, ativado em resposta à estimulação do GPR40 pelo oleato, ativa a quinase proteica dependente de Ca^{2+}, da classe calmodulina, a PKD1 e não uma quinase proteica da classe da PKC. Sendo assim, em camundongos, a PDK1 parece estar envolvida na remodelação das proteínas F-actina para extrusão dos grânulos de insulina, na segunda fase da secreção desse hormônio (43).

Esses achados sugerem que o GPR40 medeie alguns dos efeitos dos ácidos graxos livres (AGL) no processo de secreção de insulina embora os mecanismos envolvidos não estejam totalmente esclarecidos. Elucidar o papel do GPR40 na secreção de insulina apenas com ácidos graxos é complexo, visto que são metabolizados intracelularmente (21, 29), o que exclui a possibilidade de agirem unicamente como moléculas sinalizadoras extracelulares. Além disso, há indícios de que alguns ácidos graxos possam ativar receptores nucleares como receptores ativados por proliferador de peroxissomo α (44), participando de outras vias de sinalização. Nesse contexto, vários pesquisadores estudam moléculas que atuem exclusivamente como sinalizadores extracelulares capazes de agirem como secretagogos por ativação exclusiva do GPR40. Com esse objetivo, um grande número de agonistas sintéticos do GPR40 foi proposto nos últimos seis anos (41, 45-52).

Com a finalidade de estudar o efeito agonista dessas moléculas, Lu e colaboradores (53) avaliaram o encaixe e dinâmica molecular de oito agonistas do GPR40. Esse estudo identificou os resíduos de aminoácidos críticos do GPR40 que estão envolvidos no reconhecimento pelos agonistas. De acordo com esses pesquisadores, agonistas que possuem ácido carboxílico em sua estrutura, como GW9508, possuem o sítio ligante do carboxilato interagindo diretamente com dois

resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Arg183 e Arg258) presentes no receptor GPR40. Por outro lado, para agonistas não-carboxílicos o grupo eletronegativo desses ligantes (por exemplo, grupo carbonil) está envolvido na interação com a Arg183 ou com Arg258, sendo assim, em contraste com os agonistas carboxílicos, essa interação eletrostática é mais fraca e por isso, a atividade agonista dos carboxílicos é muito maior do que a dos agonistas não-carboxílicos.

O GW9508 (Figura 1) é um agonista do GPR40 que foi originado do ácido propanóico (45, 46). Sua estrutura química é composta por características farmacológicas que preenchem os requisitos para uma interação efetiva do GW9508 com o sítio ativo do GPR40 (54). Em estudo farmacológico do GW9508, a capacidade de ativação do GPR40 pelo GW9508 é potencialmente maior do que o observado para os ácidos graxos de cadeia longa, incluindo o ácido linoleico, ácido α-linolênico, ácido palmitoleico e cis-5,8,11,14,17-ácido eicosapentaenoico (36). Outro agonista do GPR40, o TAK-875, também apresentou potencial mais elevado do que ativadores endógenos e mostrou ser 400 vezes mais potente do que o ácido oleico na ativação do GPR40 em células *Chinese hamster ovary* (CHO-hGPR40), células que expressam o GPR40/FFA1 humano. Esse agonista apresentou EC_{50} = 0,072 µM, enquanto que o ácido oleico apresentou EC_{50} = 29,9 µM (41).

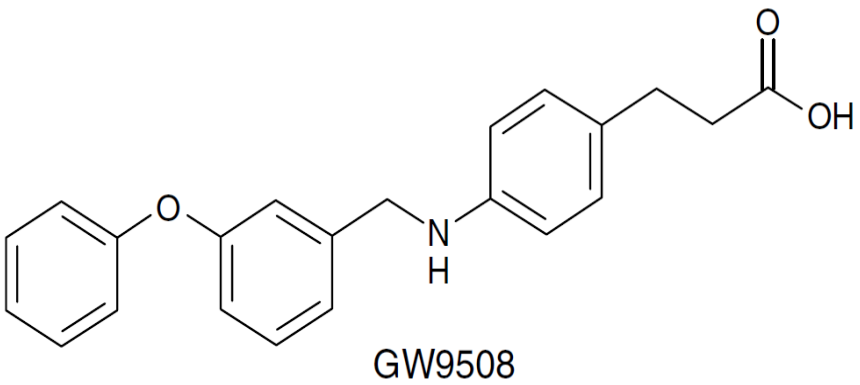

Figura 1. Estrutura química do GW9508, agonista do receptor de membrana GPR40.
FONTE: Briscoe e colaboradores (36)

Estudos sobre os efeitos fisiológicos dos agonistas seletivos do GPR40 tentam elucidar o mecanismo da via de sinalização intracelular induzida pelo fármaco. Com esse objetivo, Briscoe e colaboradores (36) mostraram potencialização no aumento do Ca^{2+} intracelular estimulada pelo GW9508 dependente da concentração de glicose em células secretoras de insulina MIN6. Outros estudos mostraram que a ativação do GPR40 por ácidos graxos resulta em aumento da $[Ca^{2+}]_i$ mediado pela $G\alpha_{q/11}$ (33) e a dependência da presença de alta concentração de glicose para a ocorrências da resposta ao GW9508 (36).

1.4 Linhagem celular BRIN-BD11

A linhagem BRIN-BD11 foi desenvolvida, no hospital New England Deaconess, por eletrofusão de célula RINm5F, uma célula não responsiva a glicose, com célula B de ilhota de rato, na intenção de criar uma célula que fosse imortalizada e que apresentasse a função secretória (55). As células BRIN-BD11 apresentam sensibilidade à glicose com desempenho secretor de insulina comparáveis às ilhotas de ratos e linhagens celulares como a INS-1 e MIN6 (56). São estáveis em cultura por até 50 passagens (55) e responsivas a uma ampla gama de secretagogos como aminoácidos (55, 57, 58), hormônios, neurotransmissores, sulfonilureias, e outras drogas (59, 60). Adicionalmente, as células BRIN-BD11 expressam o GPP40 (Figura 2) e sendo excelente ferramenta para estudo desse receptor de membrana e a NADPH oxidase.

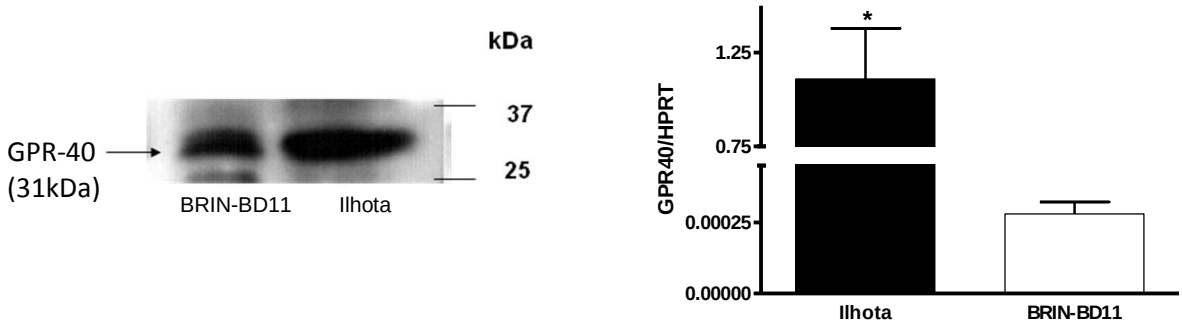

Figura 2. Expressão proteica e gênica do GPR40 em células BRIN-BD11.
Em (A) está representado uma ilustração de Western Blotting e em (B) está representado o resultado da análise de expressão gênica, realizados em células BRIN-BD11 e ilhotas pancreáticas, mostrando que essas células expressam e traduzem a proteína GPR40.
Imagem gentilmente cedida por Eloisa Villas Boas.

1.5 Enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (NADPH oxidase)

Dentre as enzimas produtoras de espécies reativas de oxigênio (EROs) estão as xantinas oxidases (61), as peroxidases lipídicas (62), o citocromo P450 (63), as isoformas de óxido nítrico sintase (64) e a NADPH oxidase (65). A NADPH oxidase é um complexo multiproteico encontrado em diversas células de origem mesodermal, possuindo como substrato o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e é uma das principais fontes de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em neutrófilos (65). Essa enzima inicialmente descrita em células fagocitárias do sistema imunológico (66) é também expressa em vários outros tecidos, inclusive em células secretoras de insulina (67, 68)

Em células fagocitárias em repouso, a NADPH oxidase é formada por duas subunidades associadas à membrana a $gp91^{phox}$ (ou NOX2) e a $p22^{phox}$ (“phox” vem de *phagocyte oxidase*), e pelas subunidades citosólicas regulatórias a $p67^{phox}$, a $p40^{phox}$ e a $p47^{phox}$ (69-71). A proteína $p22^{phox}$ é considerada essencial para a estruturação e ativação da NADPH oxidase (72), pois em junção com a $gp91^{phox}$ forma a proteína heterodimérica ligada à membrana referida como flavocitocromo b558 (65, 73, 74) sendo esse o centro redox da NADPH oxidase (73). Entretanto, para que a enzima seja ativada faz-se necessária a translocação dos fatores citosólicos ao complexo flavocitocromo b558.

Quando a célula é exposta a metabólitos que estimulam a atividade da enzima NADPH oxidase, como a glicose, ocorre a fosforilação em serina e em treonina do componente $p47^{phox}$ e isso faz com que todo o complexo citosólico ($p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e $p40^{phox}$) migre para a membrana e ligue-se ao complexo de membrana da NADPH oxidase (75-77). Sabe-se que em células fagocitárias em repouso, a proteína $p47^{phox}$ está inteiramente livre do citoesqueleto, enquanto que a maioria das proteínas $p67^{phox}$ está associada ao citoesqueleto do citosol (78). Enquanto em repouso, a proteína $p40^{phox}$ está fortemente acoplada a $p67^{phox}$ (79) e, durante a ativação da enzima, essas subunidades migram para a membrana para em seguida se dissociarem (80, 81). A subunidade $p47^{phox}$ é responsável por reorganizar as subunidades citosólicas ($p67^{phox}$ e $p40^{phox}$) promovendo a migração

das mesmas para a membrana (82, 83). A fosforilação da $p47^{phox}$ leva a uma mudança conformacional dessa enzima, permitindo que o seu domínio SH3 interaja com a $p22^{phox}$ em sua porção aminoterminal, enquanto que a porção carboxiterminal está associada com a $p67^{phox}$ (84). A associação entre o complexo citoplasmático e citocromo b558 ativa a NADPH oxidase e leva a grande produção de ânion superóxido (85).

Diversas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de relacionar a participação de quinases proteicas na ativação do complexo enzimático NADPH oxidase. Acredita-se que a PKC tenha papel importante na via de sinalização para a ativação da enzima por provocar a fosforilação em serina da subunidade $p47^{phox}$ (75-77, 86, 87). Pesquisas realizadas com neutrófilos de camundongo *knockout* para PKCβ mostrou a participação dessa quinase na ativação da NADPH oxidase. Porém, há indícios de haver um componente independente de PKCβ envolvido nessa ativação (88). Esse componente poderia ser a PKD que promove a fosforilação da subunidade $p40^{phox}$ e $p47^{phox}$, sugerindo que a ativação paralela dessa proteína quinase pode ser necessária para a ativação completa da oxidase (89).

1.5.1 Espécies reativas de oxigênio

As subunidades da NADPH oxidase leucocitária atuam como cadeias de transporte de elétrons e utilizam o oxigênio molecular (O_2) como aceptor final de elétrons. O aumento transitório do consumo de oxigênio por essas células devido à atuação da enzima NADPH oxidase é um fenômeno denominado de *burst* respiratório. Através da redução da molécula de oxigênio, a enzima catalisa a produção de ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e utiliza, preferencialmente, como doador de elétrons a molécula de NADPH. Os radicais superóxido são convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em reação espontânea ou em reação de dismutação catalisada pela superóxido dismutase (SOD). A interação entre H_2O_2 e $O_2^{\bullet -}$ conduz à formação do radical hidroxila $OH^{\bullet}$, que juntamente com o $O_2^{\bullet -}$ e o H_2O_2 contribuirão para a eliminação de bactérias e de outros agentes invasores (65, 71, 90).

Estudos sugerem que a produção excessiva de EROs é prejudicial, porém, os radicais superóxido possuem papel essencial em vias de sinalização importantes para o funcionamento celular adequado (91). Oxidantes como o $O_2^{\bullet -}$ e o H_2O_2, em condições não tóxicas, podem agir como moléculas sinalizadoras devido à capacidade de alterar o estado de fosforilação de proteínas, expressão gênica e sinalização dependente de cálcio (92).

Pesquisas demonstraram que as *mitogen activated protein quinases* (MAPK) são ativadas pelo H_2O_2 modulando a expressão de diversos genes (93). A via de transmissão de sinais e de ativação da transcrição da janus quinase (JAK/STAT) também é ativada pelo H_2O_2 (94), sugerindo que o H_2O_2 pode participar da transmissão de mensagens para o núcleo através dessa via (93). Além de interferir na ativação de moléculas envolvidas na sinalização intracelular, as EROs podem ainda afetar o fator de transcrição AP-1 (ativador da proteína-1), um complexo composto por genes c-*jun* e c-*fos.* O AP-1 pode ser formado pela homodimerização JUN/JUN ou pela heterodimerização JUN/FOS e, é responsável pelo controle da expressão de muitos genes incluindo TGF-1β e citocinas. A atividade do AP-1 é controlada por mecanismos transcricionais pós-transcricionais e pós-transducionais. O H_2O_2 causa ligeiro aumento da ligação do AP-1 ao DNA, independente da síntese de novas proteínas, indicando que a ativação é resultado de modificações pós-transducionais nas proteínas JUN e FOS. Essas alterações são consequências de alterações na fosforilação padrão das subunidades de AP-1(95).

As EROs também modulam a concentração de cálcio intracelular por provocarem um influxo desses íons por meio da produção de inositol fosfatos. O H_2O_2 induz a fosforilação em tirosina da fosfolipase Cγ (PLCγ), que produz inositol 1,4,5 - trifosfato (IP_3) e esse liga-se ao receptor IP_3/Ca^{2+}, no reticulo endoplasmático, elevando a $[Ca^{2+}]_i$ (96). O aumento da concentração da $[Ca^{2+}]_i$ é a somatória ao influxo do Ca^{2+} extracelular com o remanejamento do Ca^{2+} dos estoques intracelulares (97).

Estudos demonstraram que, nas células B, o H_2O_2 aumenta a concentração da $[Ca^{2+}]_i$ através do aumento da liberação do Ca^{2+} dos estoques intracelulares e pelo aumento do influxo do Ca^{2+} através da membrana plasmática por meio ao canal de Ca^{2+} tipo L (98). Assim, nas células secretoras de insulina, a manutenção de uma

concentração basal de H_2O_2 pode ser necessária para a resposta secretória de insulina induzida pela glicose, o que não aconteceria quando a NADPH oxidase, enzima responsável por grande parte da produção EROs nas ilhotas pancreáticas, está inibida.

1.6 Proteínas quinases

As quinases proteicas C (PKC) foram identificadas pela primeira vez como quinase proteica em serina/treonina, pertencentes a uma família de quinases proteicas que participam na transdução intracelular de um grande número de sinais extracelulares (99) que envolvem a sinalização de diversos eventos como proliferação celular, apoptose, contração de células musculares lisas e secreções celulares (100, 101).

As isoformas das PKCs são, de forma geral, formadas por cadeias de polipeptídios simples compreendidas entre uma região reguladora aminoterminal (N-terminal) com 20 a 70 kDa e uma região catalítica carboxi-terminal (C-terminal) com aproximadamente 45 kDa (102). As isoformas da família das PKCs são subdivididas em quatro subgrupos que diferem em relação à estrutura e função: (I) as PKCs clássicas ou convencionais α (alfa) , βI (beta), βII e γ (gama) que são ativadas por diacilglicerol e por Ca^{2+}; (II) as PKCs novas δ (delta), ε (épsilon), η (eta) e θ (teta) que são similarmente ativadas por DAG, mas não respondem ao Ca^{2+}; (III) as PKCs atípicas ζ (zeta) e ι (iota), conhecida como λ (lâmbda) em camundongo, que são insensíveis ao Ca^{2+} e ao DAG para a ativação mas são alostericamente ativadas por interação com seu domínio Phox/Bem1; (IV) quinases relacionadas a PKC (PKN1, 2 e 3) que são ativadas por Rac e Rho (103).

Devido a sua amplitude de funções, as PKCs são sempre muito estudas suscitando discussões sobre a classificação das isoformas. Em 1994, pesquisadores isolaram um gene de quinase proteica serina/treonina do DNA humano com forte homologia aos domínios da família de PKC e por isso foi descrita como uma isoforma atípica da PKC, a PKCμ (micro) (104). Estudo concomitante mostrou a caracterização de um novo modelo de quinase proteica em ratos, a PKD, que foi descrita como uma serina/treonina quinase com estrutura incomum e cujo domínio

catalítico é distinto da PKC (105). Esses dois trabalhos abordavam proteínas com mesma homologia, a PKCμ presente em humanos e a PKD presente em ratos e que ambas ligam-se ao DAG e possuíam a mesma afinidade a esteres de forbol quanto as PKCs convencionais e novas (105-107). Assim, essa quinase proteica (PKCμ/PKD) foi incluída na família PKC, a qual pertence ao grupo de AGC (incluindo PKA, PKG e PKC) (99, 108), o que contribuiu para a definição da PKD como pertence à família das PKCs. Nos anos seguintes foram descobertas outras duas isoformas codificadas por diferentes genes, a PKD2 (109) e PKCv(ni)/PKD3 (110, 111). Finalmente, para ultimar a homologia do gene das PKDs, um estudo do genoma de superfamílias de quinases proteicas, realizado em 2003, mostrou que as três isoformas que se conhece de PKD (1, 2 e 3) são classificadas como pertencentes ao grupo das quinases dependente de Ca^{2+}/calmodulina (CaMKs) e não mais do grupo AGC (112).

A molécula de DAG pode regular a PKD diretamente, ligando-se ao domínio catalítico dessa enzima, (113) ou indiretamente induzindo a ativação da PKD via fosforilação dependente de PKC (114). Trabalhos mostraram que as isoformas de PKC que podem ativar a PKD são as PKCs novas (δ, ε, η e θ) (114, 115) e a convencional PKCα (116). Adicionalmente, sabe-se hoje que as PKCs encontradas nas células B são α, β, δ, ε, ζ e ı/λ (117, 118), enquanto que a PKD mais abundante em células B parece ser a PKD1(classificação inclui a PKD de rato e a sua homóloga em humano, a PKCμ) (43).

As PKDs são encontradas no citoplasma de diferentes tipos celulares, mesmo quando as células não são estimuladas (119-121) e, em menor escala, podem ser encontradas nos compartimentos celulares como golgi, mitocôndria (122, 123) e membrana plasmática (119, 120). Além disso, em resposta à ativação do receptor, as PKDs podem ser rapidamente translocadas do citosol para diferentes compartimentos celulares (119-121). A translocação da PKD1 para a membrana plasmática ocorre em resposta a fatores de crescimento, agonistas de receptores acoplados a proteína G, ligantes de receptores das células B e ésteres de forbol (119, 120).

Pesquisas relacionadas com células secretoras de insulina mostraram que a PKD está envolvida na regulação da secreção de insulina em resposta ao receptor

muscarínico M3 (124, 125), um protótipo de receptor acoplado a proteína $G_{\alpha q/11}$ (126, 127). Um estudo recente mostrou que das três isoformas de PKD, a PKD1 é a mais abundantemente expressa em ilhotas isoladas de camundongo (43). Além do mais, células INS832/13 incubadas com oleato mostram rápida fosforilação de PKD nos aminoácidos Ser-744/748 e Ser-916 sem mudanças na expressão de PKD1 em todos os extratos celulares(43). A proteína PKD1 presente no citoplasma é rapidamente ativada em resposta à estimulação do GPR40 por oleato sugerindo que a PKCδ não está envolvida nesse processo de sinalização (43), como foi proposto por Kong e colaboradores (124).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que o GW9508 é um potente agonista seletivo do GPR40 que, via proteína Gαq, induz a extrusão dos grânulos de insulina e parece estar relacionada à ativação a PKC e/ou PKD, as quais podem levar a ativação da NADPH oxidase em ilhotas, parece-nos oportuno avaliar o papel do GPR40 na ativação do complexo enzimático e consequentemente na produção de espécies reativas de oxigênio.

3 OBJETIVO

Avaliar em células BRIN-DB11 a participação do GPR-40 na ativação da enzima NADPH oxidase e a consequente produção de EROs.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células BRIN-BD11

As células BRIN-BD11 foram cultivadas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 completo, com pH 7,4, suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino), 2 mM de glutamina, 20 mM de HEPES, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. A manutenção do cultivo se deu através de duas a três replicações por semana, sendo cultivadas $1{,}0 \times 10^6$ células em cada garrafa de 75 cm^3 contendo 10 ml de meio de cultura.

4.2 Cultura das células BRIN-BD11 com RNA de interferência para proteína $p22^{phox}$

As células BRIN-BD11 foram incubadas em meio RPMI contendo 11,1 mM de glicose por um período de 24 horas em placas de 6 ou 24 poços. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e transfectadas por 7 horas a 37 ^{0}C em meio Optimem (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com 11,1 mM de glicose, Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na presença de 40 nM de RNA de interferência para $p22^{phox}$ (RNAi-$p22^{phox}$) ou RNA controle (RNAc) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) ou apenas lipossomos. Após o tempo de transfecção, as células foram incubadas por 48 horas.

4.2.1 Estudo da viabilidade celular após o tratamento de células BRIN-BD11 com RNAi-$p22^{phox}$

Após a transfecção com RNAi-$p22^{phox}$ (item 4.2) foi retirado o meio de cultura de incubação e esse foi reservado. As células foram soltas da placa com 200 µL de tripsina que foi posteriormente inativada com o meio reservado e em seguida as células suspensas foram centrifugadas. O sobrenadante foi retirado e as células suspendidas em 300 µL de PBS e adicionado 30 µL de solução de iodeto de propídio (20 mg por mililitro em PBS). O iodeto de propídio é um fluocromo de

afinidade aos ácidos nucleicos impermeável à membrana. Esse composto é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm que são captadas por citometria de fluxo. As células que apresentam integridade de membrana exibem baixa fluorescência quando excitadas pelo laser, enquanto que células cuja membrana esteja rompida permitem a entrada de iodeto de propídio, que se liga ao DNA, emitindo alta fluorescência.

4.3 Expressão gênica dos componentes da enzima NADPH oxidase em células BRIN-BD11 por PCR em tempo real

Para análise da expressão gênica dos componentes da enzima NADPH oxidase, $1{,}0 \times 10^7$ células foram incubadas em meio RPMI com 11,1 mM de glicose por 24 horas. Para extração do RNA total das células, essas foram homogeneizadas com o reagente Trizol até completa solubilização e incubado durante 5 min a temperatura ambiente. Em seguida foi acrescido 0,2 ml de clorofórmio a cada 1 mL de Trizol. O sobrenadante é separado por centrifugação (12.000 g, 15 min, 4ºC), e o RNA contido na fase aquosa foi retirado e precipitado com 500 μl de isopropanol, e em seguida foi lavado com etanol 75% e dissolvido em água deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Os RNAs obtidos são quantificados por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Em seguida, 3 μg de RNA de cada amostra foi submetida à reação de transcrição reversa com *primers* randômicos para a síntese do DNA complementar. A cada tubo com 3 μg do RNA total foi adicionado tampão DNAse 10X e DNAse (1U/μL). Após incubação de 25 minutos a 25°C a DNAse foi inibida com EDTA (25 mM), em seguida foram adicionados primers randômicos e os reagentes tampão RT 5X, DTT (100 mM) e dNTP mix (10 mM). A enzima Tanscriptase Reversa SuperScript II é adicionada e as amostras são incubadas. A reação é realizada utilizando termociclador *Multicycler PTC-0200* (*Mj Researc. Inc*, Walhan, MA, USA). A expressão gênica foi então avaliada por PCR em tempo real utilizando equipamento Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Austrália) e a sonda fluorescente Syber Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), que intercala com o DNA e permite uma quantificação fluorimétrica. A expressão da HPRT (hipoxantina fosforibosiltransferase) é

determinada em paralelo como controle da reação. As sequências utilizadas dos pares de primer estão descritas na Tabela 1. A expressão do RNA para cada gene foi normalizada pela expressão do gene constitutivo.

Tabela 1. Sequências de nucleotídeos dos pares de primers utilizados para análise da expressão gênica da p47^{phox}, gp91^{phox}, p22^{phox} p67^{phox}, p40^{phox} e do gene constitutivo HPRT. Os primers foram desenhados a partir das sequências depositadas no *Genbank*.

Primer	Sequência
p47^{phox}	Sense: 5'- CTT CAT TCG CCA CAT CGC -3' Antisense: 5'- TTT CTG TAG ACC ACC TTC TCC G -3'
gp91^{phox}	Sense: 5'- TGC CCA GTA CCA AAG TTT GCC -3' Antisense: 5'-GAC CCA CGA TCC ATT TCC AAG -3'
p22^{phox}	Sense: 5'- GAG GTC CGC AAG AAG CCA AG -3' Antisense: 5'- GAA ACT CAA GCA GGA GCC ACT G -3'
p67^{phox}	Sense: 5'- TAC ACC ATC CTG GAC AAC CTG C 3' Antisense: 5'- TCC TCG CTG GAA GTA AGC CAC -3'
p40^{phox}	Sense: 5'- GCC ATC TCA GCC AAC ATC GC -3' Antisense: 5'- TCT TGC TCT CTG GTC CAA ACC G -3'
HPRT	Sense: 5'- GCT GAA GAT TTG GAA AAG GTG T -3' Antisense: 5'- ACA GAG GGC CAC AAT GTG AT -3'

4.4 Western Blotting de células BRIN-DB11

4.4.1 Western Blotting para análise de expressão proteica dos componentes da enzima NADPH oxidase

Para análise da expressão proteica dos componentes da enzima NADPH oxidase, 1,0x10^7 células foram incubadas por 24 horas em placas de seis poços com 5 ml de meio RPMI com 11,1 mM de glicose. Após o período de incubação a extração da proteína foi realizada com o tampão de lise RIPA dez vezes concentrado, de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de

proteína presente em cada amostra foi determinada através do método de Bradford (128), utilizando albumina bovina como padrão. Após o cálculo da concentração de cada amostra, cerca e 60 µg de proteína total foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) seguida de transferência para membrana de PVDF. Em seguida as membranas foram tratadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS) e incubadas com anticorpo primário para os componentes da enzima NADPH oxidase: policlonal anti-p47^{phox,} policlonal anti-p67^{phox,} policlonal anti-p22^{phox}, policlonal anti-gp91^{phox}, policlonal anti-p40^{phox} e com anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase (Amersham Bioscences, UK). Finalmente as membranas foram reveladas utilizado o kit ECL (Amersham Bioscences), seguidas de exposição ao filme de raio-x.

4.4.2 Western Blotting para análise de eficiência de transfecção com RNAi-p22^{phox}

Foram incubadas 1,0x10^{6} células em garrafas de 25 ml, com 5 ml de meio RPMI contendo 11,1 mM de glicose por 24 horas. Após as 48 horas de incubação pós-transfecção (item 4.2), o meio Optimen foi retirado, as células foram lavadas com PBS frio. A extração de proteínas foi feita utilizando tampão de homogeneização (Tris10 mM, EDTA 1 mM, sacarose 250 mM) acrescido de inibidores de proteases (leupeptina e aprotinina). Foram homogeneizadas, sonicadas e transferidas para microtubos identificados. As amostras passaram pelo processo de purificação de membrana (129) adaptado para células BRIN-BD11. As células foram centrifugadas a 1000 g a 4ºC por 15 minutos para separação por sedimentação do núcleo, esse foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 g a 4ºC por 15 minutos para separação por sedimentação da membrana plasmática. Nesse ponto, o sobrenadante foi armazenado como proteínas citosólicas enquanto que o precipitado (membrana plasmática) foi suspenso e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (128) em espectrofotômetro. De cada amostra avaliada, 40 µg de proteínas diluídas em tampão laemmli foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) seguida de transferência para membrana de PVDF. A membrana foi tratada com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em BPS) em seguida

incubada com anticorpo primário policlonal anti-p22^{phox} (Abican, Cambridge, Massachusetts, EUA) ou anti-5'nucleotidase (Santa Cruz) como constitutivo de membrana, e com anticorpos secundários anti-IgG (Amersham Bioscences) marcados com peroxidase. Posteriormente, a membrana foi exposta ao ECL (Amersham Bioscences) e a luminescência foi revelada em lâminas de raios-X.

4.4.3 Western Blotting para análise de fração proteica de citoplasma e de membrana plasmática de p40^{phox} e p47^{phox}

Foram incubadas 1,0x10^7 células em garrafas de 75 ml, com 10 ml de meio RPMI contendo 11,1 mM de glicose por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e a cada garrafa foi adicionada solução de Krebs Henseleit a 2,8 mM de glicose e foram pré-incubadas em incubadora de CO_2 (5%) por 20 minutos. Após o período, a solução de pré-incubação foi retirada e foi adicionada a solução de Krebs Henseleit, com concentração de glicose 5,6 mM, na ausência ou presença de 20 µM do fármaco agonista do GPR40, GW9508. A extração de proteínas foi feita em diferentes tempos de incubação (0, 5, 10, 20 e 30 minutos) utilizando tampão de homogeneização (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, sacarose 250 mM) acrescido de inibidores de proteases (leupeptina e aprotinina) e fosfatases (pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio e ortovanadato de sódio). Foram homogeneizadas, sonicadas e transferidas para microtubos identificados. As amostras passaram pelo processo de purificação de membrana (129) adaptado para células BRIN-BD11. As células foram centrifugadas a 1000 g 4ºC por 15 minutos para separação por sedimentação do núcleo, esse foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 g 4ºC por 15 minutos para separação por sedimentação da membrana plasmática. Nesse ponto, o sobrenadante foi armazenado como proteínas citosólicas enquanto que o precipitado (membrana plasmática) foi novamente suspendido em tampão de homogeneização e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (128) em espectrofotômetro. De cada amostra avaliada, 40 µg de proteínas diluídas em tampão laemmli foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE 15%) seguida de transferência para membrana de PVDF. A membrana foi tratada com solução bloqueadora (10% de albumina) em seguida incubada com

anticorpo primário policlonal anti-p40^{phox} (Upstate) ou anti-p47^{phox} (Santa Cruz Biotechnology) e com anticorpos secundários anti-IgG (Amersham Bioscences) marcados com peroxidase. Posteriormente, a membrana foi exposta ao ECL (Amersham Bioscences) e a luminescência foi revelada em foto documentador.

4.5 Secreção estática de insulina de células BRIN-BD11

4.5.1 Secreção estática de insulina

Foram incubadas em meio RPMI contendo 11,1 mM de glicose 1,5x10^5 células/poço em placas de 24 poços por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e a cada poço foi adicionada solução de Krebs Henseleit com 11,1 mM de glicose e foram pré-incubadas em incubadora de CO_2 (5%) por 20 minutos. Após o período, a solução de pré-incubação foi retirada e foi adicionada a solução de Krebs Henseleit com diferentes concentrações de glicose (2,8, 5,6, 8,3, 11,1, 16,7 e 20,0 mM) na ausência ou presença de 20 µM do fármaco agonista do GPR40, GW9508 por 60 minutos. Após o fim do tempo de incubação foi retirada uma alíquota do meio e essas amostras foram centrifugadas a 400 g por cinco minutos, para remoção de possíveis células soltas, e em seguida foram transferidas para microtubos com tampa, que foram devidamente acondicionados para posterior dosagem de insulina. As células aderidas às placas foram lavadas com PBS frio e homogeneizadas em tampão de lise RIPA (Upstate) para a extração de proteínas. As proteínas foram quantificadas em espectrofotômetro utilizando o método de Bradford (128).

4.5.2 Dosagem de insulina

A determinação da quantidade de insulina secretada foi determinada por radioimunoensaio. Para realização do ensaio, prepara-se uma solução reagente que inclui (i) quantidades conhecidas de anticorpo, (ii) quantidades conhecidas de insulina marcada com iodo radioativo (I^{125}) (Amershan Biosciences) e (iii)

quantidades desconhecidas de hormônio não radioativo (amostra). Como as duas formas do hormônio, radioativas e não radioativas, competem por um mesmo número de locais de ligação no anticorpo, quanto mais hormônio não radioativo estiver presente, menos o hormônio radioativo irá se ligar. O complexo marcado formado, insulina-anticorpo, é precipitado com polietilenoglicol e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia). Juntamente com o ensaio, foi preparada uma curva padrão, na qual a relação ligado/livre para o hormônio radioativo é plotada como função da concentração do hormônio não radioativo. A relação ligado/livre do hormônio radioativo é maior quanto menor número de não radioativo estiver presente. A seguir, a curva padrão foi utilizada para determinar a concentração do hormônio em cada amostra.

4.6 Análise do conteúdo de ânion superóxido de células BRIN-BD11

O conteúdo de superóxido foi determinado utilizando-se o método de fluorescência com dihidroetídeo. A hidroetidina ou dihidroetídeo (DHE) é uma sonda redox-sensível, extensamente usada para detectar a produção intracelular de ânion superóxido. A reação entre o superóxido e o DHE resulta na formação de um produto oxidado que intercala-se às bases de DNA, corando o núcleo com uma fluorescência vermelha que pode ser analisado por citometria de fluxo.

Para todos os experimentos realizados foram utilizados $2{,}5 \times 10^5$ células/poço em placas de 24 poços contendo meio RPMI com 11,1 mM de glicose por 24 horas para adesão das células. Posteriormente, o protocolo seguido foi diferente para cada experimento como descrito a seguir.

4.6.1 Estímulo de glicose

O meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e a cada poço foi adicionada solução de Krebs Henseleit a 11,1 mM de glicose e foram pré-incubadas em incubadora de CO_2 (5%) por 20 minutos. Após o período, a solução de pré-incubação foi retirada e foi adicionada solução de Krebs Henseleit preparada

com diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1; 16,7 e 20,0 mM) e as células foram incubadas por 60 minutos nas condições descritas acima.

4.6.2 Estímulo de glicose com GW9508

O meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e a cada poço foi adicionada solução de Krebs Henseleit a 11,1 mM de glicose e foram pré-incubadas em incubadora de CO_2 (5%) por 20 minutos. Após o período, a solução de pré-incubação foi retirada e foi adicionada a solução de Krebs Henseleit preparada com estímulos de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1; 16,7 e 20,0 mM) na ausência ou presença de 20 µM de GW9508, e as células foram incubadas por 60 minutos nas condições descritas acima.

Esse mesmo protocolo foi seguido para células que passaram por transfecção com RNA de interferência após as 48 horas de incubação.

4.6.3 Estímulo de glicose com VAS2870 e/ou GW9508

O meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e a cada poço foi adicionada a solução de Krebs Henseleit a 11,1 mM de glicose e foram pré-incubadas em incubadora de CO_2 (5%) por 20 minutos na ausência ou presença de VAS2870 (pré-incubação com 12 µM). Após o período, a solução de pré-incubação foi retirada e foi adicionada solução de Krebs Henseleit preparada com estímulos de glicose (5,6 e 16,7 mM) na ausência ou presença de 20 µM GW9508, e/ou 12 µM VAS2870 durante 60 minutos.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da secreção de insulina em células BRIN-BD11, em diferentes concentrações de glicose, na presença ou ausência do agonista farmacológico do receptor GPR40, GW9508

5.1.1 Secreção estática de insulina

Na Figura 3 estão apresentados os resultados de três experimentos que foram realizados com o objetivo de definir a concentração adequada de GW9508 a ser utilizada para estimular o GPR40 em células BRIN-BD11. Esse procedimento foi imprescindível visto que não há dados na literatura sobre o uso de GW9508 em células BRIN-BD11. Estudos com células secretoras de insulina INS-1E e MIN6 realizados pela comunidade científica, foram levados em consideração na escolha das concentrações testadas. A secreção estática de insulina foi realizada incubando as células com 2,8 e 16,7 mM de glicose, na ausência ou presença de GW9508 nas concentrações 10, 15 e 20 µM. O resultado obtido que melhor representou o efeito do GW9508 como secretagogo ocorreu na concentração de 20 µM do fármaco, conforme representado pela Figura 3-C. A secreção de insulina foi significativamente aumentada pelo GW9508 (29%) ($P<0,001$) na presença de 16,7 mM de glicose.

Após definida a concentração de GW9508, novos experimentos foram realizados na presença e ausência desse fármaco em concentrações crescentes de glicose. Os resultados apresentados na Figura 4 mostram o efeito de potencialização que o GW9508 exerce na secreção de insulina em elevadas concentrações de glicose nas células BRIN-BD11, aumentando em 57% e 43% na presença de 16,7 e 20,0 mM de glicose respectivamente.

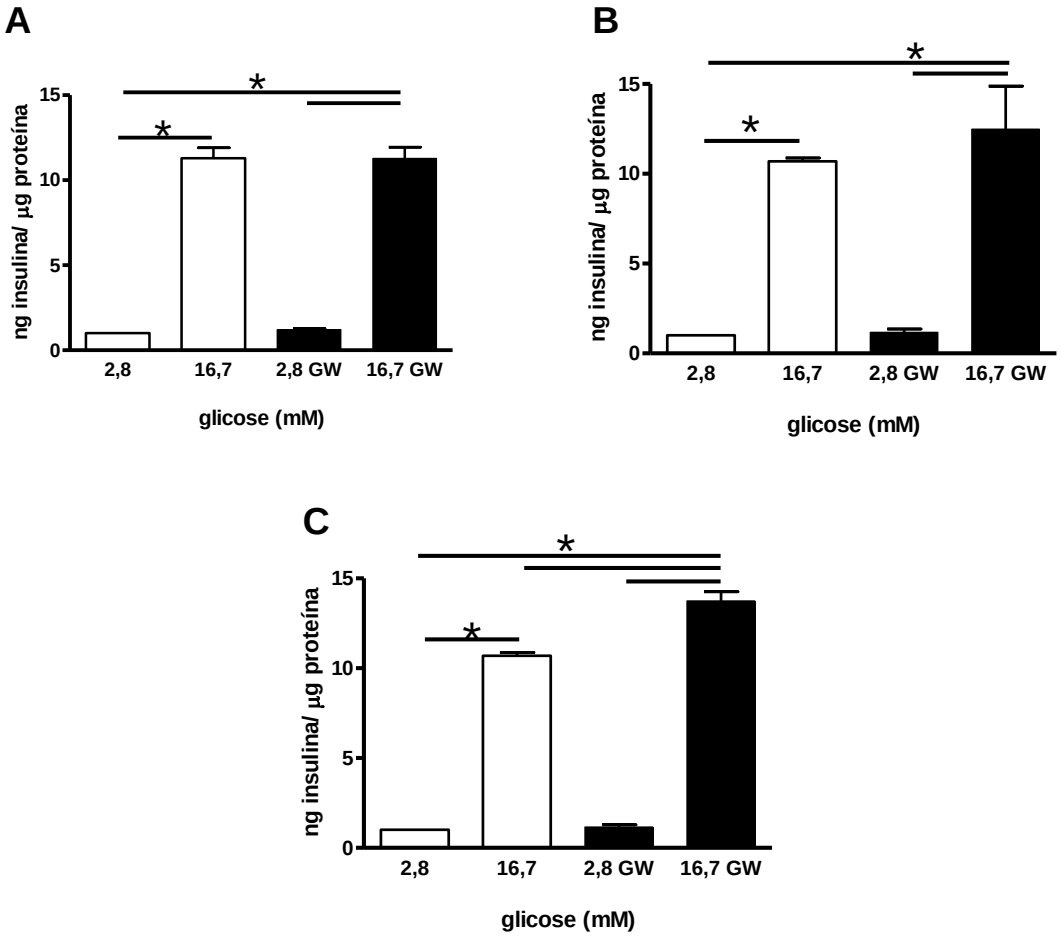

Figura 3. Teste de concentração de GW9508 a ser utilizado em células BRIN-BD11. As células foram incubadas por 20 minutos com 2,8 ou 16,7 mM de glicose na ausência (□) ou presença (■) de GW9508: 10 µM (A); 15 µM (B); 20 µM (C). Os resultados são expressos como ng/µg de proteína, teste estatístico One-way ANOVA seguido por Tukey e n=3 para cada condição. *P<0,001.

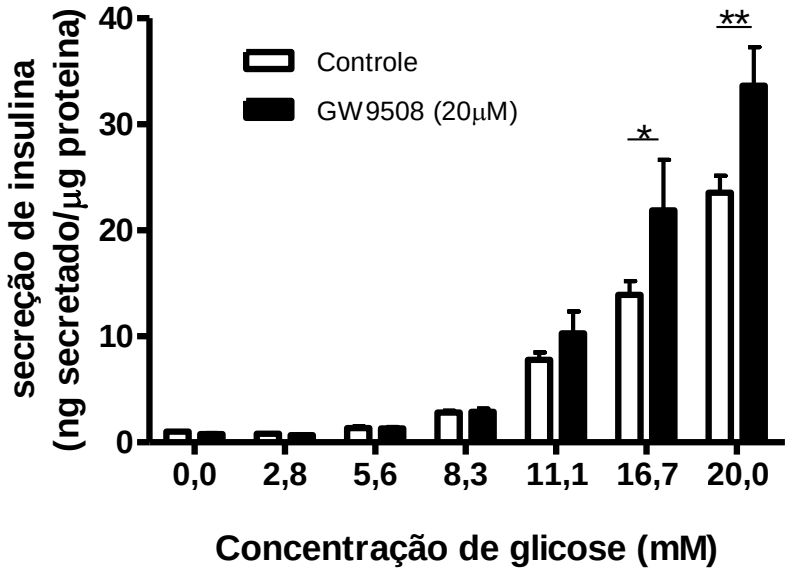

Figura 4. Efeito do GW9508 na secreção de insulina dependente de glicose de células BRIN-BD11.
Após estimulação por 60 minutos, a secreção de insulina foi maior na presença (■) de GW9508 (20 µM) em altas concentrações de glicose quando comparado ao controle (□). Os resultados são expressos como ng/mg de proteína média ± EP, teste estatístico One-way ANOVA seguido por Tukey e n=4. *P<0,05, **P<0,01.

5.2 Avaliação da expressão gênica e proteica dos componentes da enzima NADPH oxidase em células BRIN-BD11

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram que as células BRIN-BD11 e seu controle positivo, as ilhotas pancreáticas de ratos Wistar, expressam os genes dos componentes de membrana $p22^{phox}$ (A), $gp91^{phox}$ (B) e os componentes citoplasmáticos $p67^{phox}$ (C), $p47^{phox}$ (D) e $p40^{phox}$ (E) da NADPH oxidase.

Na Figura 6 estão apresentadas imagens das bandas relacionadas aos componentes proteicos da NADPH oxidase nas células BRIN-BD11 e do controle positivo (ilhotas pancreáticas der ratos Wistar). Os experimentos realizados por Western Blotting evidenciam que as células BRIN-BD11 expressam os componentes de membrana $p22^{phox}$ (A) e $gp91^{phox}$ (B), e os componentes citoplasmáticos $p67^{phox}$ (C), $p47^{phox}$ (D) e $p40^{phox}$ (E) da NADPH oxidase.

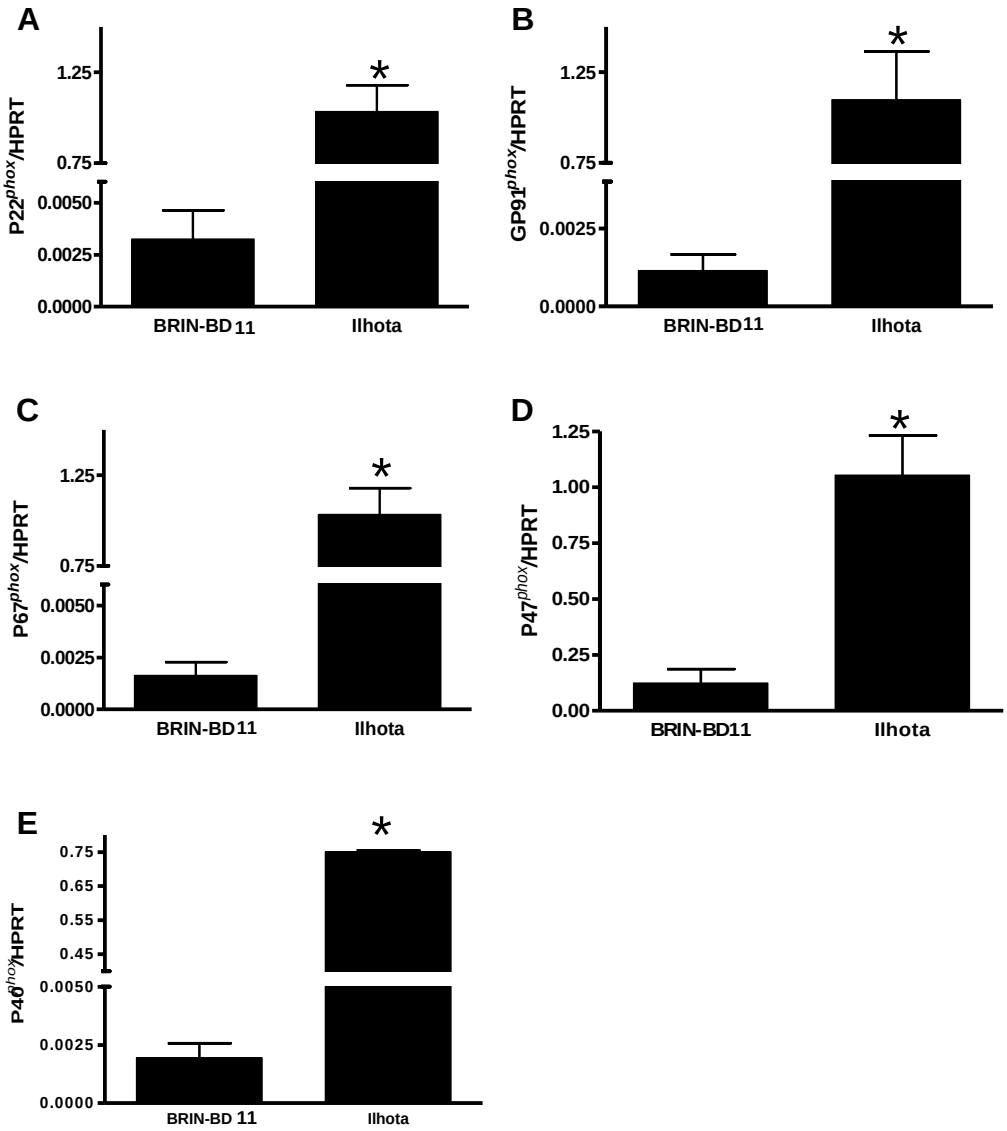

Figura 5. Expressão gênica dos componentes da enzima NADPH oxidase em células BRIN-BD11

As células BRIN-BD11, assim como seu controle positivo (ilhotas de ratos Wistar), expressam os genes dos componentes de membrana $p22^{phox}$ (A) e $gp91^{phox}$ (B) e dos componentes citoplasmáticos $p67^{phox}$ (C), $p47^{phox}$ (D) e $p40^{phox}$ (E) da NADPH oxidase. Os resultados são expressos como a razão de genes por genes constitutivos, média ± erro padrão, teste estatístico Test t, n=4. *P<0,001.

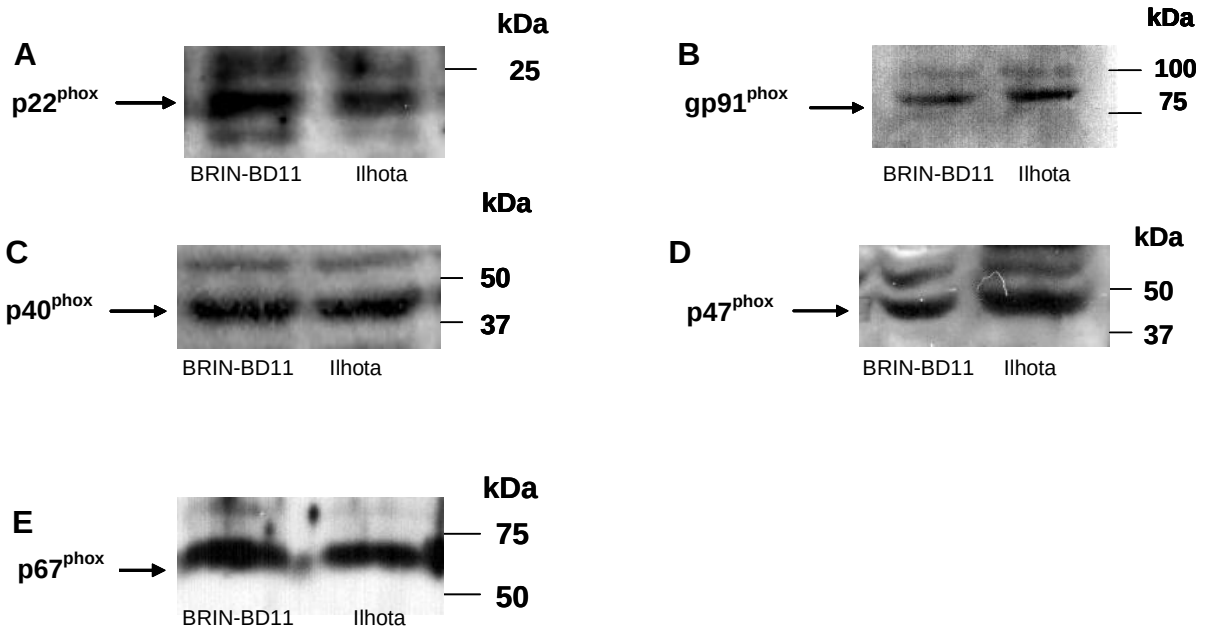

Figura 6. Expressão proteica dos componentes da NADPH oxidase em células BRIN-BD11 e Ilhotas de Langherans de ratos Wistar como controle positivo
As células BRIN-BD11 expressam os componentes proteicos de membrana $p22^{phox}$ (A) e $gp91^{phox}$ (B), e os componentes proteicos citoplasmáticos $p40^{phox}$ (C), $p47^{phox}$ (D) e $p67^{phox}$ (E) da NADPH oxidase. O resultado é ilustrativo de um dos experimentos realizados com a mesma técnica (n=6).

5.3 Avaliação do conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11

5.3.1 Caracterização do conteúdo de superóxido após estímulo agudo de glicose

O conteúdo de superóxido das células BRIN-BD11 tende a diminuir com o aumento da concentração de glicose no meio de incubação ($P<0,05$) quando comparado com baixas concentrações de glicose (Figura 7). Na presença de 16,7 mM e 20,0 mM de glicose, o conteúdo de superóxido cai 25% e 35% respectivamente, em relação às

células incubas em meios contendo 2,8 mM de glicose. O conteúdo de superóxido das células BRIN-BD11 em zero concentração de glicose é 10 vezes maior do que o conteúdo em 2,8 mM de glicose (dados não apresentados).

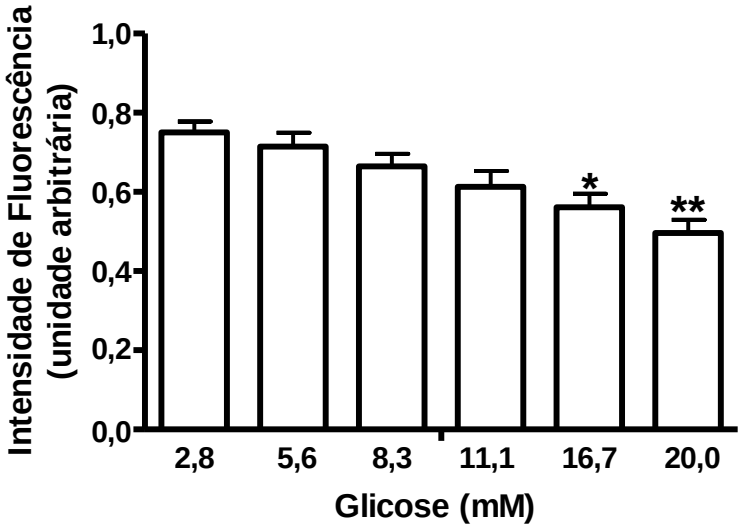

Figura 7. Conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 após estímulo de 60 minutos em diferentes concentrações de glicose
As células foram incubadas com 2,8, 5,6, 8,3, 11,1, 16,7 e 20,0 mM de glicose e a intensidade da fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como unidade arbitrária de fluorescência, média ± erro padrão, teste estatístico One-way ANOVA seguido por Tukey, n=7. **P<0,05 vs 2,8; 5,6 e 8,3 mM de glicose; *P<0,05 vs 2,8 e 5,6 mM de glicose.

5.3.2 Caracterização do conteúdo de superóxido após estímulo agudo de glicose na presença ou ausência de GW9805

A Figura 8 mostra que as células BRIN-BD11, quanto estimuladas com GW9508 apresentam o mesmo padrão de redução do conteúdo de superóxido com o aumento da concentração de glicose no meio de incubação, confirmando os dados da Figura 7.

A avaliação do conteúdo de superóxido estimulado por GW9508 mostra também que esse agonista do GPR40 possivelmente aumente a atividade da NADPH oxidase por provocar aumento significativo (P< 0,05) do conteúdo de superóxido, principalmente em baixa concentração de glicose (Figura 8).

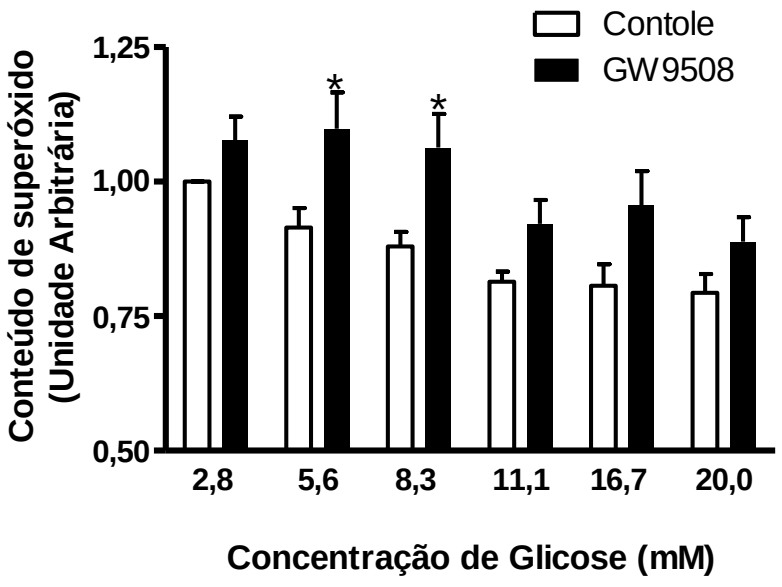

Figura 8. Curva de conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 pós-estímulo de 60 minutos em diferentes concentrações de glicose, na ausência (○) ou presença (●) de GW9508

As células foram incubadas com 2,8, 5,6, 8,3, 11,1, 16,7 e 20,0 mM de glicose e a intensidade da fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como unidade arbitrária de fluorescência, média ± EP, teste estatístico One-way ANOVA seguido por Tukey, n=8. *P<0,05 vs ausência de GW9508.

5.4 Translocação das proteínas citoplasmática da NADPH oxidase $p47^{phox}$ e $p40^{phox}$ quando estimuladas com GW9508

A análise da fração citosólica e de membrana feitas por densitometria das bandas das proteínas $p47^{phox}$ e $p40^{phox}$ da enzima NADPH oxidase mostra que a proteína $p47^{phox}$ (Figura 9) migra para a membrana plasmática após 10 a 20 minutos de incubação com GW9508 (20 µM) e que a proteína $p40^{phox}$ não apresenta diferença estatística na translocação (Figura 10).

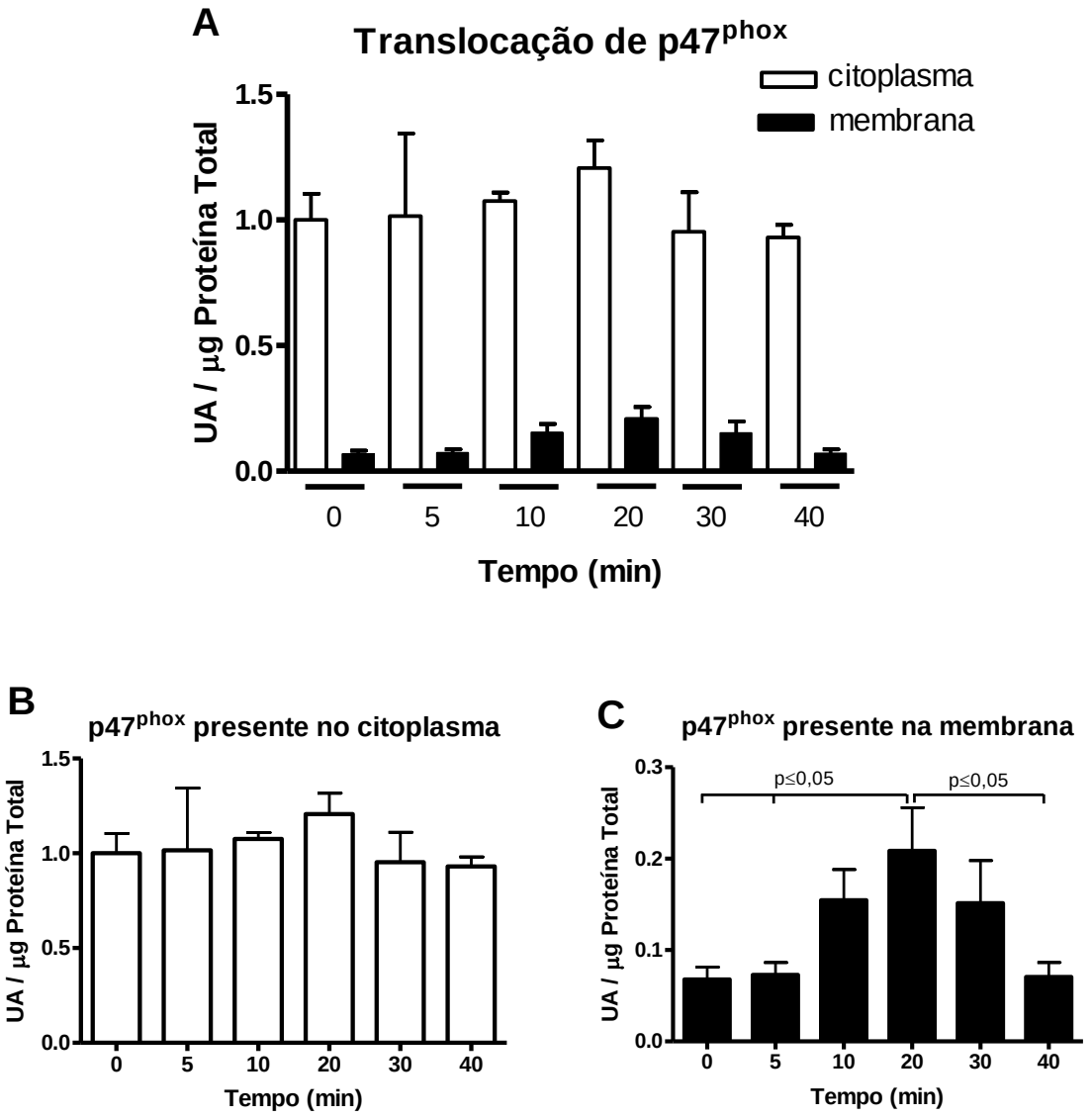

Figura 9. Análise quantitativa da proteína p47^{phox} em fração citosólica e de membrana quando expostas ao GW9508 (20 µM), no tempo indicado (A)
Os gráficos B e C representam as frações de citoplasma e de membrana separadamente. As células foram incubadas na presença de 5,6 mM de glicose e 20 µM de GW9508 nos tempos 0, 5, 10, 20, 30 e 40 minutos. Os resultados mostram que ocorreu translocação da proteína p47^{phox} do citoplasma para a membrana plasmática como está representado na figura C. O pico da translocação ocorreu entre 10 e 30 minutos de incubação.

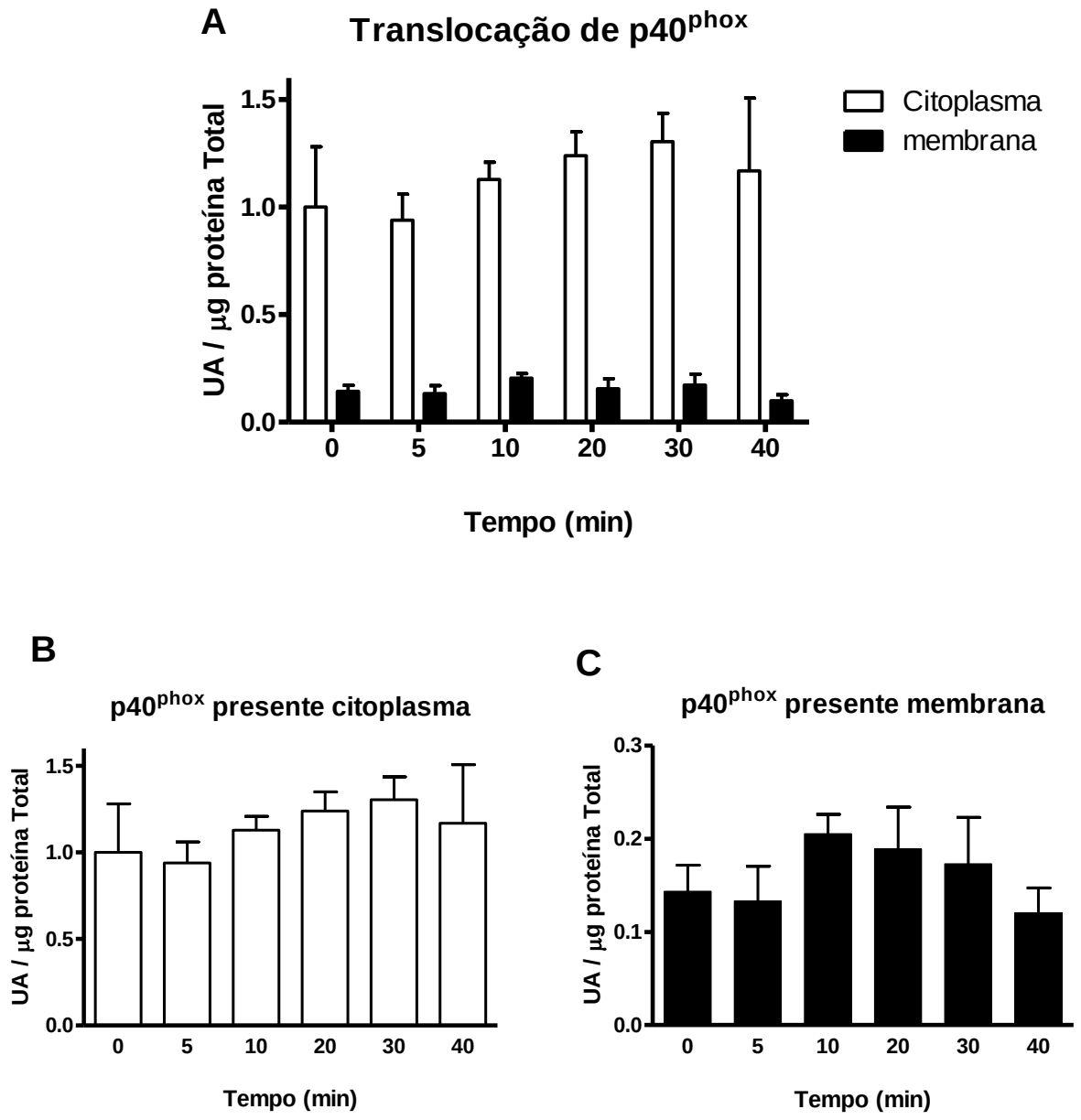

Figura 10. Análise quantitativa da proteína p40^{phox} em fração citosólica e de membrana quando expostas ao GW9508 (20 µM), no tempo indicado (A)
Os gráficos B e C representam as frações de citoplasma e de membrana separadamente. As células foram incubadas com 5,6 mM de glicose e 20 µM de GW9508 nos tempos 0, 5, 10, 20, 30 e 40 minutos.

5.5 Knockdown da subunidade p22^{phox} da NADPH oxidase pela técnica de RNA de interferência em células BRIN-BD11

5.5.1 Viabilidade celular após o tratamento com RNAi-p22^{phox}

Na Figura 11 pode-se observar que acima de 95% das células transfectadas com RNAc e com RNAi-p22^{phox} são viáveis, o que valida o protocolo experimental.

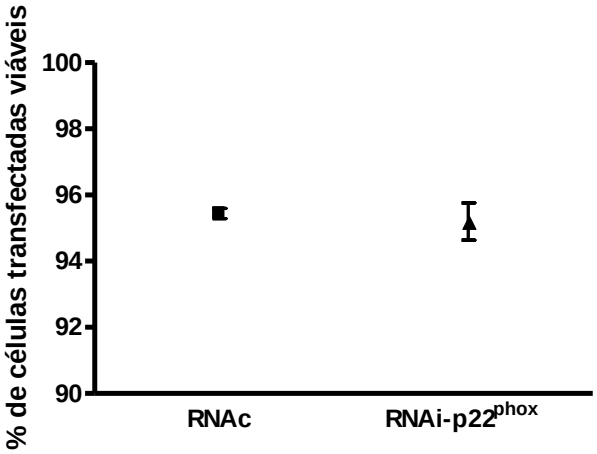

Figura 11. Viabilidade celular de células BRIN-BD11 transfectadas com RNAc (■) e RNAi-p22^{phox} (▲)
O protocolo de viabilidade foi realizado após 48 horas de incubação após transfecção de 7 horas com RNAc ou RNAi-p22^{phox} (40 nM). Os resultados aferidos por citometria de fluxo indicam que acima de 95% das células são viáveis por possuírem membrana celular íntegra. Os resultados são expressos como porcentagem de células transfectadas viáveis, média ± erro padrão, estatística Teste T, n=3. As diferenças não são significativas.

5.5.2 Expressão proteica da subunidade p22^{phox}

O resultado das densitometrias da subunidade proteica da NADPH oxidase, a proteína p22^{phox}, mostra que o lipossomo utilizado como mecanismo para transfecção não alterou significativamente a quantidade de proteína das células com lipossomos no meio (L) em relação às células controle (C) sem lipossomos no meio, (Figura 12). Além disso, os resultados mostram que em células transfectadas com

RNAi-p22^{phox}, a expressão da p22^{phox} esteve significativamente menor (P<0,01) quando comparada ao RNA controle, mostrando que a interferência foi bem sucedida e com valores de inibição em torno de 48%.

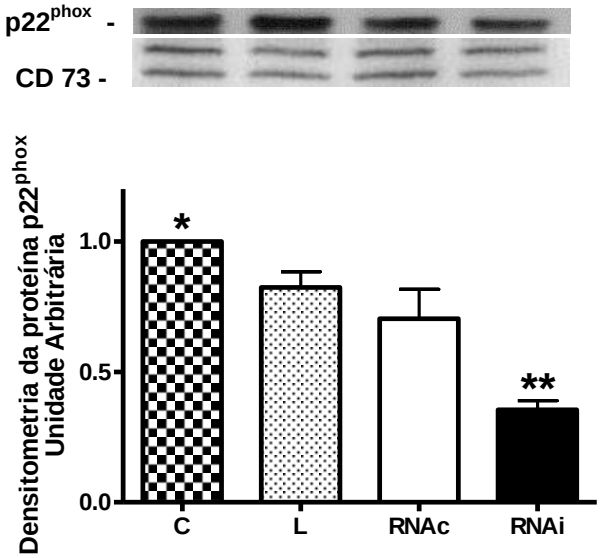

Figura 12. Expressão proteica da subunidade da NADPH oxidase, p22^{phox}, em células controle (C), com lipossomos (L) e transfectadas com RNAc ou RNAi-p22^{phox} na presença de lipossomos

A análise por Western Blotting foi realizada após 48 horas de incubação após transfecção de 7 horas com RNAc ou RNAi-p22^{phox} (40 nM). Os anticorpos utilizados foram o anti-p22^{phox} e anti-5'nucleotidase (CD-73). Os resultados são expressos como unidade arbitrária de densitometria média ± erro padrão, teste estatístico One-way ANOVA seguido por Tukey, n=3. *P<0,05 vs RNAc e RNAi; **P<0,01 vs RNAc.

5.5.3 Conteúdo de superóxido em diferentes concentrações de glicose

O resultado apresentado na Figura 13 representa o conteúdo de superóxido de células transfectadas com RNAc ou RNAi-p22^{phox} em baixa e alta concentração de glicose. Pode-se observar que as células transfectadas com RNAi-p22^{phox} apresentam redução do conteúdo de superóxido assim como as células BRIN-BD11 transfectadas com RNAc (Figura 7).

Além disso, os resultados mostraram que o *knockdown* da proteína p22^{phox} nas células BRIN-BD11, causa diminuição em torno de 22% no conteúdo de

superóxido dessas células para todas as concentrações de glicose testadas, apresentando diferença significativa nas concentrações 5,6 e 20,0 mM de glicose.

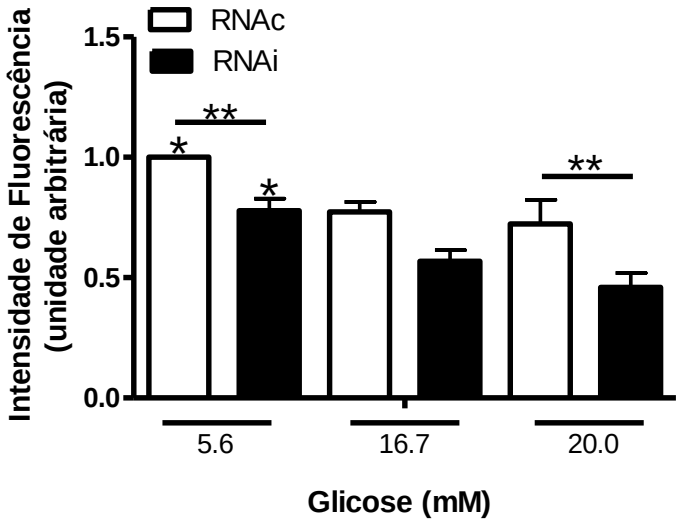

Figura 13. Conteúdo de superóxido em células BRIN-BD11 transfectadas com RNAc ou RNAi-p22^{phox} após estímulo de 60 minutos em diferentes concentrações de glicose

A inibição da NADPH oxidase por RNAi-pp22^{phox} promoveu diminuição do conteúdo de superóxido das células em torno de 22% em relação ao controle negativo (RNAc). Os resultados são expressos como unidade arbitrária de intensidade de fluorescência média ± erro padrão, teste estatístico One-way ANOVA seguido por Tukey, n=5. *P<0,05 vs 16,7 e 20,0 mM glicose (respectiva condição para RNAc ou RNAi); **P<0,05.

5.5.4 Conteúdo de superóxido de células transfectadas com RNAi-p22^{phox} na presença ou ausência de GW9508

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que células BRIN-BD11 transfectadas com RNAi-p22^{phox} apresentam diminuição do conteúdo de superóxido em 5,6, 16,7 e 20 mM de glicose e o estímulo com GW9508 não causa aumento no conteúdo de superóxido nessas células.

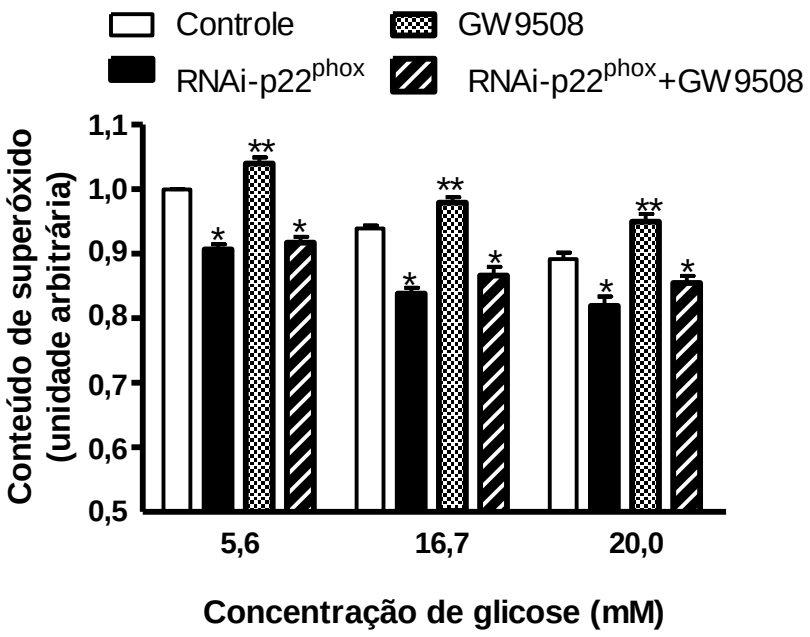

Figura 14. Conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 transfectadas com RNAc ou RNAi-p22^{phox}, pós-estímulo de 60 minutos em diferentes concentrações de glicose, na ausência ou presença de GW9508 (20 µM)
Células com reduzida expressão da p22^{phox} apresentam diminuição do conteúdo de superóxido e o GW9508 não exerce aumento nesse conteúdo de superóxido reduzido. Os resultados são expressos como unidade arbitrária de intensidade de fluorescência média ± erro padrão, teste estatístico two-way ANOVA seguido por Bonferroni, n=13. *P<0,05 vs Controle (respectiva condição de glicose) e **P<0,05 vs Controle e P<0,001 vs RNAi-p22^{phox}; e RNAi-p22^{phox}+GW9508 (respectiva condição de glicose).

5.6 Conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11 incubadas com inibidor farmacológico da enzima NADPH oxidase, VAS2870, na presença e ausência de GW9508

Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que o estímulo com GW9508 aumenta o conteúdo de superóxido em 18% (em 5,6 mM glicose) e 20% (em 16,7 mM glicose), enquanto que o VAS2870 reduz o conteúdo de superóxido, inibindo a NADPH oxidase em 25% e 23% (em 5,6 e 16,7 mM glicose respectivamente). A inibição da NADPH oxidase causada pelo VAS2870 não foi revertida pelo GW9508.

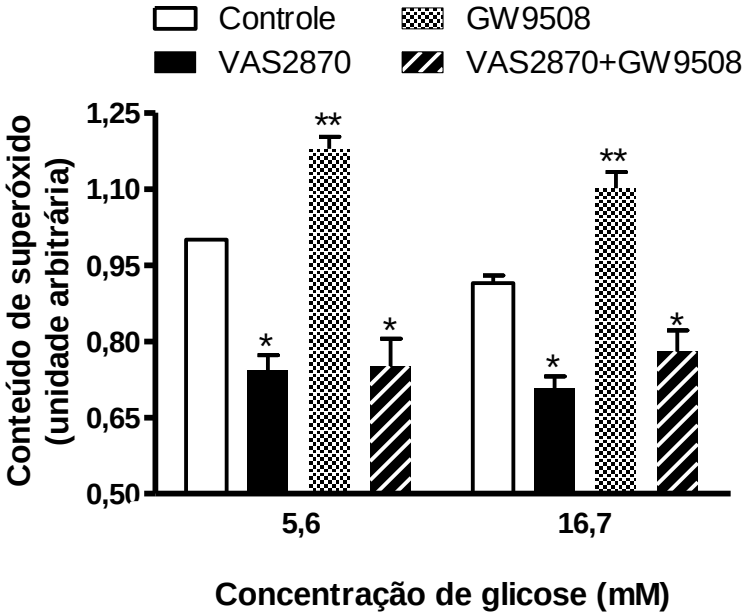

Figura 15. Efeito do GW9508 (20 µM) e VAS2870 (12 µM) no conteúdo de superóxido de células BRIN-BD11

O GW9508 aumenta enquanto que o VAS2870 reduz o conteúdo de superóxido. A inibição da NADPH oxidase causada pelo VAS2870 não foi revertida pelo GW9508. Os resultados são expressos em unidades arbitrarias de intensidade de fluorescência média ± erro padrão, teste estatístico two-way ANOVA seguido por Bonferroni, n=7. *P<0,001 vs controle (da respectiva condição de glicose) e **P<0,001 vs controle, VAS2870 e VAS2870+GW9508 (respectiva condição de glicose).

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Linhagens celulares secretoras de insulina têm sido frequentemente utilizadas como ferramentas de auxílio em pesquisas voltadas para o entendimento da fisiologia da secreção de insulina pelas células B pancreáticas. McClenaghan e colaboradores (58), pesquisando sobre a capacidade secretória das células BRIN-BD11, mostraram, em ensaios de secreção dinâmica de insulina, que quando se eleva a concentração de glicose de 8,3 mM para 16,7 mM, as células triplicam sua capacidade secretória, o que está em concordância com o resultado obtido e representado pela Figura 3. A linhagem celular BRIN-BD11 possui captação de glicose eficiente por expressar o transportador de glicose GLUT-2, ausente em várias outras linhagens produtoras de insulina (130). Além disso, a atividade da glicoquinase é alta na linhagem BRIN-BD11 e, dessa forma, o chamado “sensor de glicose” formado pelo GLUT-2 e pela glicoquinase é bastante eficiente nessas células (130, 131). Assim, o aumento da secreção de insulina por essas células é dependente da elevação da concentração de glicose, o que é acompanhado por despolarização da membrana, resultado da metabolização da glicose e consequente geração de ATP (58), como é classicamente observado em células B das ilhotas pancreáticas.

Considerando que as células BRIN-BD11 expressam o receptor de membrana GPR40, foi iniciado um estudo da secreção de insulina dessas células frente ao estímulo de GW9508 e glicose, a fim de observar se as células BRIN-BD11 apresentariam o mesmo padrão de secreção descrito na literatura (36) e avaliar os efeitos do GW9508 no processo secretório do hormônio. Quando a secreção de insulina foi avaliada na presença de concentrações crescentes de glicose (2,8, 5,6, 8,3, 11,1, 16,7 e 20,0 mM), o padrão de aumento da secreção em estímulo a alta glicose foi mantido (Figura 4). Em análise ao efeito do GW9508, foi possível notar que essa linhagem secretora de insulina segue o mesmo padrão de secreção das células MIN6 (36), onde o GW9508 potencializa a secreção de insulina em alta glicose. Nas células BRIN-BD11, essa potencialização pode ser vista na presença de 16,7 e 20,0 mM de glicose. Esta evidência demonstra a habilidade do GW9508 como secretagogo de insulina dependente da presença de concentração elevada de

glicose. Outros fármacos agonistas seletivos para GPR40, como o TAK-875, também causam efeito similar em células secretoras de insulina INS-1 833/15 (células com alta expressão endógena de GPR40/FFA1) (51) e em ilhotas isoladas de ratos Sprague-Dawley (41). Respostas similares foram encontradas com ligantes endógenos para o GPR40, como o ácido oleico, que potencializa a secreção de insulina por ilhotas isoladas de camundongos na presença de elevadas concentrações de glicose (43). O mesmo foi observado com o ácido oleico e linoleico em células MIN6 (35). Além disso, um estudo da via de sinalização do agonista TAK-875 em células CHO-hGPR40 mostrou que a estimulação do GPR40 causa aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e do IP, produto da quebra do IP_3, semelhante ao encontrado em células INS-1 833/15. Estas últimas, quando estimuladas com TAK-875, apresentam elevação da $[Ca^{2+}]_i$ estimulado pela glicose. Nota-se que a elevação da $[Ca^{2+}]_i$ é maior quanto maior a concentração de glicose e de TAK-875 (41).

Pesquisas realizadas com ilhotas de ratos e ligantes endógenos do GPR40 sugerem que o palmitato livre é capaz de aumentar a secreção de insulina por aumentar a probabilidade de abertura dos canais para Ca^{2+} do tipo-L e por aumentar o número dos grânulos já ancorados - ou *readily releasable pool* (132). Em células INS-1E, pesquisas com palmitato apontam o GPR40 como mediador do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e secreção de insulina através da via Gαq-PLC, resultando na liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e levando ao aumento da probabilidade de abertura dos canais para Ca^{2+} do tipo-L, previamente ativados pela glicose (34). Entretanto, há autores que defendem a hipótese de que a principal fonte de aumento do cálcio intracelular em resposta a ativação da via Gαq-PLC pelos ácidos graxos, em células B dispersas (33) e em células MIN6 é a ativação de canais para Ca^{2+} do tipo-L (35), visto que seu bloqueio compromete a amplificação da secreção de insulina mediada pelos ácidos graxos na secreção estimulada pela glicose (35). De fato, o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ em resposta aos ácidos graxos parece ser devido a modulação da atividade de canais de Ca^{2+} do tipo-L enquanto uma menor participação é oriunda da mobilização de cálcio dos estoques de cálcio do retículo endoplasmático (33, 133).

Para dar continuidade aos estudos moleculares intracelulares, foi necessária a caracterização da NADPH oxidase na linhagem celular BRIN-BD11. Sabe-se que essa enzima é presente em ilhotas pancreáticas de ratos Wistar (134) e que por

gerar íons superóxidos, pode ser importante na sinalização intracelular de células B pancreáticas visto que a NOX2 está associada a vesículas secretoras de insulina e isso sugere que pode haver um controle redox da exocitose dos grânulos (135). Os resultados apresentados nas Figura 5 e Figura 6 mostram que as subunidades $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$ da NADPH oxidase estão presentes nessa linhagem celular. A Figura 7 mostra que o conteúdo de superóxido dessas células tende a diminuir conforme aumenta a concentração de glicose no meio. Há fortes indícios de que isso ocorra como consequência da ativação dos mecanismos de defesa antioxidantes na presença de alta concentração de glicose. Em ilhotas de ratos, a glicose ativa a NADPH oxidase (68), porém é acompanhada pelo aumento da atividade da superóxido dismutase (136) e de outras enzimas antioxidantes, causando redução no teor total de espécies reativas de oxigênios (EROs) na presença de altas concentrações de glicose. Isso demonstra que as ilhotas pancreáticas ajustam o conteúdo intracelular de EROs de acordo com o fornecimento de glicose e que este controle desempenha um papel-chave na regulação fina da secreção de insulina induzida pela glicose (137).

O agonista do GPR40 aumenta o conteúdo de superóxido em diferentes concentrações de glicose (Figura 8). Esse fato pode ser explicado pelo aumento da atividade da NADPH oxidase visto que ocorre translocação da proteína $p47^{phox}$ para a membrana na presença do GW9508 (Figura 9). Além disso, células BRIN-BD11 que tiveram a NADPH oxidase inibida com RNAi-$p22^{phox}$ (Figura 13 e Figura 14) ou com VAS2870 (Figura 15) apresentam conteúdo de superóxido reduzido, o qual não foi revertido pela estimulação com GW9508. Assim, foi demonstrado que a ativação do GPR40 leva a ativação da NADPH oxidase em linhagem de células secretoras de insulina em diferentes concentrações de glicose. Porém ainda não é compreendido por qual via de sinalização o GPR40 é capaz de ativá-la.

Sabe-se que em células B, a ligação do ácido graxo ao GPR40 ativa a proteína $G\alpha_{q/11}$ (35) que leva à ativação da PLC (37-39), que por sua vez, induz a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato dando origem ao $IP_{3,}$ e também ao DAG (56). Pouco se sabe a partir da ativação do DAG até a extrusão dos grânulos de insulina via $G\alpha_q$-PLC. Como a via não está totalmente esclarecida, existem controvérsias sobre a ativação de moléculas subsequentes. O DAG parece ativar

tanto proteína quinase dependente de Ca^{2+}, da classe calmodulina, a PKD1 (43), quanto proteínas quinases da classe da PKC (138, 139).

Pesquisas realizadas em células secretoras de insulina com um inibidor de PKCs, calfostin C, mostrou que o conteúdo de superóxido induzido pelo oleato (140) e palmitato (139) estiveram reduzidos na presença do calfostin C, sugerindo que a indução de aumento de superóxido por ácidos graxos pode estar correlacionada à ativação da PKC, a qual parece induzir a translocação da $p47^{phox}$ do citoplasma para a membrana por estimulação com Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), um ativador de PKC (87). Por outro lado, o grupo de Ferdaoussi e colaboradores (43) observaram que em células INS832/13 a estimulação aguda com oleato em alta glicose induz rápida fosforilação de PKD, com aumento de translocação da PKD1 do citosol para a membrana. A inibição farmacológica ou deleção do gene codificador da PKD1, em animais *knockout*, bloqueia a potencialização da secreção de insulina estimulada pelo oleato e impede a despolimerização da F-actina, porém não afeta a resposta secretória a glicose. Sendo assim, acredita-se que a PKD fosforile proteínas que regulam a remodelação da F-actina e controle a secreção de insulina nas células B desses animais e com isso propõe que a PKD1 seja elemento na sinalização do GPR40 em resposta aos ácidos graxos. Não há relatos de que a PKD ative a NADPH oxidase em células secretoras de insulina, porém em 2002 Davidson-Moncada e colaboradores (89) sugeriram uma possível ativação da enzima pela molécula de PKD em leucócitos. Porém apesar de presentes nas células BRIN-BD11, essa enzima não seria fosforilada por estímulo com GW9508 (dados não apresentados).

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados mostram que o GW9508, um ativador específico do GPR40, potencializa a secreção de insulina pelas células BRIN-BD11 na presença de altas concentrações de glicose e aumenta o conteúdo de espécies reativas de oxigênio durante o processo de estímulo secreção de insulina induzido pela glicose. O GW9508 promove a migração da subunidade $p47^{phox}$, componente citosólico da NADPH oxidase para a membrana, comprovando a ativação do complexo enzimático pela estimulação do receptor GPR40. Considerando que o aumento do conteúdo de superóxido provocado pelo GW9508 não ocorre em células com a atividade da NADPH oxidase inibida, seja por RNAi-$p22^{phox}$ ou VAS2870 fica demonstrando, pela primeira vez, uma relação direta entre a ativação do GPR40 e a ativação da NADPH oxidase em linhagem de células secretoras de insulina.

REFERÊNCIAS[1]

1. Gyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 973 p.

2. Orci L. Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas. Diabetes. 1982;31(6 Pt 1):538-65.

3. Weir GC, Bonner-Weir S. Islets of Langerhans: the puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes. J Clin Invest. 1990;85(4):983-7.

4. Henderson JR. Why are the islets of Langerhans? Lancet. 1969;2(7618):469-70.

5. Lifson N, Kramlinger KG, Mayrand RR, Lender EJ. Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. Gastroenterology. 1980;79(3):466-73.

6. Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. Diabetes. 1982;31(10):883-9.

7. Kin T, Murdoch TB, Shapiro AM, Lakey JR. Estimation of pancreas weight from donor variables. Cell Transplant. 2006;15(2):181-5.

8. Iki K, Pour PM. Distribution of pancreatic endocrine cells including IAPP-expressing cells in non-diabetic and type 2 diabetic cases. J Histochem Cytochem. 2007;55(2):111-8.

9. HELLMAN B. Actual distribution of the number and volume of the islets of Langerhans in different size classes in non-diabetic humans of varying ages. Nature. 1959;184(Suppl 19):1498-9.

10. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Diabetes Melito. 14 ed: Artmed; 2009. 1224 p.

---

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

11. White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. Diabetologia. 1997;40 Suppl 2:S2-17.

12. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. J Endocrinol. 2014;220(2):T1-T23.

13. Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. Annu Rev Biochem. 1995;64:689-719.

14. Regazzi R, Verchere CB, Halban PA, Polonsky KS. Insulin production: from gene to granule. Diabetologia. 1997;40 Suppl 3:B33-8.

15. Hedeskov CJ. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. Physiol Rev. 1980;60(2):442-509.

16. Poian ATD, Carvalho-Alves PCd. Hormônios e Metabolismo Integração e Correlações Clínicas. São Paulo: Atheneu; 2002. 395 p.

17. Thorens B. Glucagon-like peptide-1 and control of insulin secretion. Diabete Metab. 1995;21(5):311-8.

18. Malaisse WJ, Sener A, Herchuelz A, Hutton JC. Insulin release: the fuel hypothesis. Metabolism. 1979;28(4):373-86.

19. Matschinsky FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. Diabetes. 1996;45(2):223-41.

20. Prentki M. New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. Eur J Endocrinol. 1996;134(3):272-86.

21. Prentki M, Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? Diabetes. 1996;45(3):273-83.

22. Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. Metabolic control of beta-cell function. Semin Cell Dev Biol. 2000;11(4):267-75.

23. MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ, Hasan NM, Buss JD, Kendrick MA. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;288(1):E1-15.

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. Haber EP, Ximenes HM, Procópio J, Carvalho CR, Curi R, Carpinelli AR. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta-cells. J Cell Physiol. 2003;194(1):1-12.

28. Ximenes HM, Hirata AE, Rocha MS, Curi R, Carpinelli AR. Propionate inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. Cell Biochem Funct. 2007;25(2):173-8.

29. Prentki M, Vischer S, Glennon MC, Regazzi R, Deeney JT, Corkey BE. Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. J Biol Chem. 1992;267(9):5802-10.

30. Prentki M, Matschinsky FM. Ca2+, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. Physiol Rev. 1987;67(4):1185-248.

31. 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.

32. 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.

33. Fujiwara K, Maekawa F, Yada T. Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca2+ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca2+ channel and link to insulin release. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;289(4):E670-7.

34. 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.

35. 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.

36. 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.

37. Bollheimer LC, Kemptner DM, Kagerbauer SM, Kestler TM, Wrede CE, Buettner R. Intracellular depletion of insulin: a comparative study with palmitate, oleate and elaidate in INS-1 cells. Eur J Endocrinol. 2003;148(4):481-6.

38. Poitout V. The ins and outs of fatty acids on the pancreatic beta cell. Trends Endocrinol Metab. 2003;14(5):201-3.

39. Gromada J. The free fatty acid receptor GPR40 generates excitement in pancreatic beta-cells. Endocrinology. 2006;147(2):672-3.

40. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. Endocr Rev. 2001;22(5):565-604.

41. Tsujihata Y, Ito R, Suzuki M, Harada A, Negoro N, Yasuma T, et al. TAK-875, an orally available G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist, enhances glucose-dependent insulin secretion and improves both postprandial and fasting hyperglycemia in type 2 diabetic rats. J Pharmacol Exp Ther. 2011;339(1):228-37.

42. Rybin VO, Guo J, Steinberg SF. Protein kinase D1 autophosphorylation via distinct mechanisms at Ser744/Ser748 and Ser916. J Biol Chem. 2009;284(4):2332-43.

43. Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, et al. G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. Diabetologia. 2012;55(10):2682-92.

44. Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(10):4653-7.

45. 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.

46. McKeown SC, Corbett DF, Goetz AS, Littleton TR, Bigham E, Briscoe CP, et al. Solid phase synthesis and SAR of small molecule agonists for the GPR40 receptor. Bioorg Med Chem Lett. 2007;17(6):1584-9.

47. Song F, Lu S, Gunnet J, Xu JZ, Wines P, Proost J, et al. Synthesis and biological evaluation of 3-aryl-3-(4-phenoxy)-propionic acid as a novel series of G protein-coupled receptor 40 agonists. J Med Chem. 2007;50(12):2807-17.

48. 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.

49. 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.

50. Tikhonova IG, Sum CS, Neumann S, Engel S, Raaka BM, Costanzi S, et al. Discovery of novel agonists and antagonists of the free fatty acid receptor 1 (FFAR1) using virtual screening. J Med Chem. 2008;51(3):625-33.

51. 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. Medical chemistry letters [Internet]. 2010; 1:[290-4 pp.].

52. Walsh SP, Severino A, Zhou C, He J, Liang GB, Tan CP, et al. 3-Substituted 3-(4-aryloxyaryl)-propanoic acids as GPR40 agonists. Bioorg Med Chem Lett. 2011;21(11):3390-4.

53. Lu SY, Jiang YJ, Lv J, Wu TX, Yu QS, Zhu WL. Molecular docking and molecular dynamics simulation studies of GPR40 receptor-agonist interactions. J Mol Graph Model. 2010;28(8):766-74.

54. Lu SY, Jiang YJ, Zou JW, Luo HB, Wu TX. Insight into analysis of interactions of GW9508 to wild-type and H86F and H137F GPR40: a combined QM/MM study and pharmacophore modeling. J Mol Graph Model. 2011;29(6):818-25.

55. McClenaghan NH, Barnett CR, Ah-Sing E, Abdel-Wahab YH, O'Harte FP, Yoon TW, et al. Characterization of a novel glucose-responsive insulin-secreting cell line, BRIN-BD11, produced by electrofusion. Diabetes. 1996;45(8):1132-40.

56. Hamid M, McCluskey JT, McClenaghan NH, Flatt PR. Comparison of the secretory properties of four insulin-secreting cell lines. Endocr Res. 2002;28(1-2):35-47.

57. McClenaghan NH, Barnett CR, O'Harte FP, Flatt PR. Mechanisms of amino acid-induced insulin secretion from the glucose-responsive BRIN-BD11 pancreatic B-cell line. J Endocrinol. 1996;151(3):349-57.

58. McClenaghan NH, Flatt PR. Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines. J Mol Med (Berl). 1999;77(1):235-43.

59. Brennan L, Shine A, Hewage C, Malthouse JP, Brindle KM, McClenaghan N, et al. A nuclear magnetic resonance-based demonstration of substantial oxidative L-alanine metabolism and L-alanine-enhanced glucose metabolism in a clonal pancreatic beta-cell line: metabolism of L-alanine is important to the regulation of insulin secretion. Diabetes. 2002;51(6):1714-21.

60. Brennan L, Corless M, Hewage C, Malthouse JP, McClenaghan NH, Flatt PR, et al. 13C NMR analysis reveals a link between L-glutamine metabolism, D-glucose metabolism and gamma-glutamyl cycle activity in a clonal pancreatic beta-cell line. Diabetologia. 2003;46(11):1512-21.

61. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285(6):H2290-7.

62. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. J Biol Chem. 2002;277(48):46116-22.

63. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. Circ Res. 2001;88(1):44-51.

64. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(16):9220-5.

65. Babior BM. NADPH oxidase: an update. Blood. 1999;93(5):1464-76.

66. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007;87(1):245-313.

67. 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.

68. 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.

69. Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. Circ Res. 2000;87(1):26-32.

70. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;287(5):R1014-30.

71. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. Am J Physiol. 1996;271(4 Pt 2):H1626-34.

72. Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, et al. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. J Biol Chem. 1996;271(36):22152-8.

73. Knoller S, Shpungin S, Pick E. The membrane-associated component of the amphiphile-activated, cytosol-dependent superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages is identical to cytochrome b559. J Biol Chem. 1991;266(5):2795-804.

74. Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ. A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. Circ Res. 2000;86(4):391-5.

75. Babior BM. The leukocyte NADPH oxidase. Isr Med Assoc J. 2002;4(11):1023-4.

76. Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. Biochemistry. 2002;41(24):7743-50.

77. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes. 2000;49(11):1939-45.

78. Woodman RC, Ruedi JM, Jesaitis AJ, Okamura N, Quinn MT, Smith RM, et al. Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils. J Clin Invest. 1991;87(4):1345-51.

79. Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H. Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox. J Exp Med. 1996;184(3):893-902.

80. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. Biochem J. 1993;296 (Pt 3):557-61.

81. Dusi S, Donini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. Biochem J. 1996;314 (Pt 2):409-12.

82. Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. J Biol Chem. 1999;274(35):25051-60.

83. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. J Leukoc Biol. 2005;78(5):1025-42.

84. 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.

85. Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003;285(2):R277-97.

86. Bey EA, Xu B, Bhattacharjee A, Oldfield CM, Zhao X, Li Q, et al. Protein kinase C delta is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human monocytes. J Immunol. 2004;173(9):5730-8.

87. Graciano MF, Valle MM, Kowluru A, Curi R, Carpinelli AR. Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. Islets. 2011;3(5):213-23.

88. Dekker LV, Leitges M, Altschuler G, Mistry N, McDermott A, Roes J, et al. Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. Biochem J. 2000;347 Pt 1:285-9.

89. Davidson-Moncada JK, Lopez-Lluch G, Segal AW, Dekker LV. Involvement of protein kinase D in Fc gamma-receptor activation of the NADPH oxidase in neutrophils. Biochem J. 2002;363(Pt 1):95-103.

90. Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? Free Radic Biol Med. 2000;29(5):416-24.

91. Guzik TJ, Harrison DG. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. Drug Discov Today. 2006;11(11-12):524-33.

92. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Radic Biol Med. 1997;22(1-2):269-85.

93. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. Biochem Soc Trans. 2001;29(Pt 2):345-50.

94. Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. Am J Physiol. 1998;275(6 Pt 1):C1640-52.

95. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999;39:67-101.

96. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. Cell Signal. 1999;11(1):1-14.

97. Krippeit-Drews P, Kramer C, Welker S, Lang F, Ammon HP, Drews G. Interference of H2O2 with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. J Physiol. 1999;514 (Pt 2):471-81.

98. Nakazaki M, Kakei M, Yaekura K, Koriyama N, Morimitsu S, Ichinari K, et al. Diverse effects of hydrogen peroxide on cytosolic Ca2+ homeostasis in rat pancreatic beta-cells. Cell Struct Funct. 2000;25(3):187-93.

99. Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. Biochem J. 1998;332 (Pt 2):281-92.

100. Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C--a question of specificity. Trends Biochem Sci. 1994;19(2):73-7.

101. Toker A. Signaling through protein kinase C. Front Biosci. 1998;3:D1134-47.

102. Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, et al. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. Science. 1986;233(4766):859-66.

103. Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. PKC and the control of localized signal dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(2):103-12.

104. Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. PKCu is a novel, atypical member of the protein kinase C family. J Biol Chem. 1994;269(8):6140-8.

105. Valverde AM, Sinnett-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(18):8572-6.

106. Johannes FJ, Prestle J, Dieterich S, Oberhagemann P, Link G, Pfizenmaier K. Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C mu. Eur J Biochem. 1995;227(1-2):303-7.

107. Van Lint JV, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Expression and characterization of PKD, a phorbol ester and diacylglycerol-stimulated serine protein kinase. J Biol Chem. 1995;270(3):1455-61.

108. Newton AC. Regulation of protein kinase C. Curr Opin Cell Biol. 1997;9(2):161-7.

109. Sturany S, Van Lint J, Muller F, Wilda M, Hameister H, Hocker M, et al. Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. J Biol Chem. 2001;276(5):3310-8.

110. Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, Saito T. PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu. Biochim Biophys Acta. 1999;1450(1):99-106.

111. Rey O, Yuan J, Young SH, Rozengurt E. Protein kinase C nu/protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists. J Biol Chem. 2003;278(26):23773-85.

112. Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. Genome Biol. 2003;4(5):111.

113. Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. Trends Pharmacol Sci. 2006;27(6):317-23.

114. Zugaza JL, Sinnett-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E. Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. EMBO J. 1996;15(22):6220-30.

115. Zugaza JL, Waldron RT, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Bombesin, vasopressin, endothelin, bradykinin, and platelet-derived growth factor rapidly activate protein kinase D through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. J Biol Chem. 1997;272(38):23952-60.

116. Wong C, Jin ZG. Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. J Biol Chem. 2005;280(39):33262-9.

117. Knutson KL, Hoenig M. Identification and subcellular characterization of protein kinase-C isoforms in insulinoma beta-cells and whole islets. Endocrinology. 1994;135(3):881-6.

118. Ganesan S, Calle R, Zawalich K, Greenawalt K, Zawalich W, Shulman GI, et al. Immunocytochemical localization of alpha-protein kinase C in rat pancreatic beta-cells during glucose-induced insulin secretion. J Cell Biol. 1992;119(2):313-24.

119. Rey O, Young SH, Cantrell D, Rozengurt E. Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C. J Biol Chem. 2001;276(35):32616-26.

120. Matthews SA, Iglesias T, Rozengurt E, Cantrell D. Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD). EMBO J. 2000;19(12):2935-45.

121. Rey O, Sinnett-Smith J, Zhukova E, Rozengurt E. Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation. J Biol Chem. 2001;276(52):49228-35.

122. Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V. Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. Cell. 2001;104(3):409-20.

123. Hausser A, Link G, Bamberg L, Burzlaff A, Lutz S, Pfizenmaier K, et al. Structural requirements for localization and activation of protein kinase C mu (PKC mu) at the Golgi compartment. J Cell Biol. 2002;156(1):65-74.

124. Kong KC, Butcher AJ, McWilliams P, Jones D, Wess J, Hamdan FF, et al. M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(49):21181-6.

125. Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, et al. Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. Cell. 2009;136(2):235-48.

126. Caulfield MP. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. Pharmacol Ther. 1993;58(3):319-79.

127. Wess J, Eglen RM, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. Nat Rev Drug Discov. 2007;6(9):721-33.

128. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

129. Picinato MC, Curi R, Machado UF, Carpinelli AR. Soybean- and olive-oils-enriched diets increase insulin secretion to glucose stimulus in isolated pancreatic rat islets. Physiol Behav. 1998;65(2):289-94.

130. McClenaghan NH, Elsner M, Tiedge M, Lenzen S. Molecular characterization of the glucose-sensing mechanism in the clonal insulin-secreting BRIN-BD11 cell line. Biochem Biophys Res Commun. 1998;242(2):262-6.

131. McClenaghan NH. Physiological regulation of the pancreatic {beta}-cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes. Exp Physiol. 2007;92(3):481-96.

132. Olofsson CS, Salehi A, Holm C, Rorsman P. Palmitate increases L-type Ca2+ currents and the size of the readily releasable granule pool in mouse pancreatic beta-cells. J Physiol. 2004;557(Pt 3):935-48.

133. Zhao YF, Pei J, Chen C. Activation of ATP-sensitive potassium channels in rat pancreatic beta-cells by linoleic acid through both intracellular metabolites and membrane receptor signalling pathway. J Endocrinol. 2008;198(3):533-40.

134. 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.

135. Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renström E, et al. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. Diabetes. 2005;54(7):2132-42.

136. 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.

137. 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.

138. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. Endocr Rev. 2001;22(5):565-604.

139. 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.

140. Santos LR, Rebelato E, Graciano MF, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR. Oleic acid modulates metabolic substrate channeling during glucose-stimulated insulin secretion via NAD(P)H oxidase. Endocrinology. 2011;152(10):3614-21.