

ELOISA APARECIDA VILAS BOAS

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

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fontes de energia para a célula beta

1.1.1 Glicose

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

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

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

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

1.1.2 Ácidos graxos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Lipotoxicidade

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

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

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

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

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

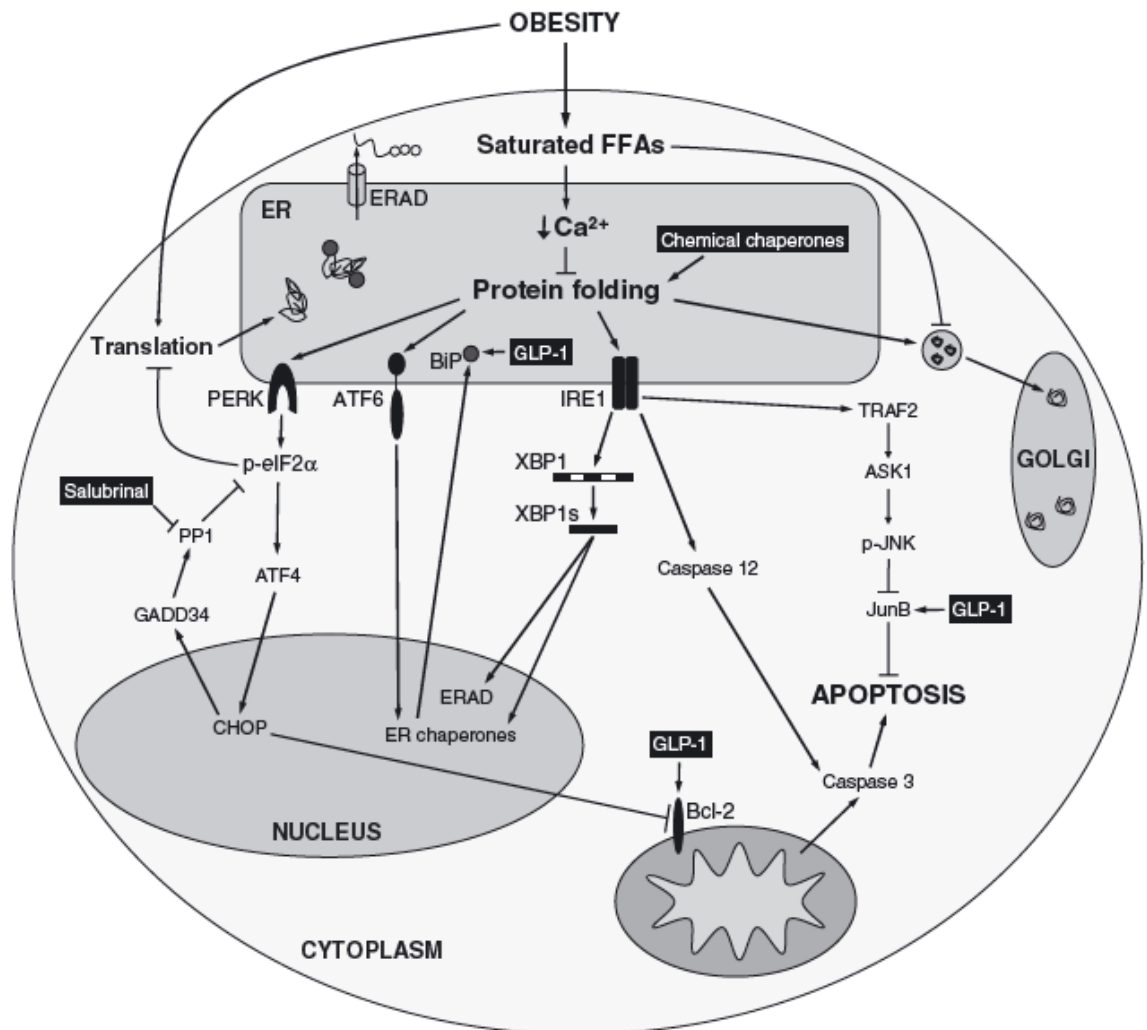
1.3 Ácidos graxos e estresse de retículo endoplasmático

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

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

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

Figura 1 – Vias envolvidas no estresse de retículo endoplasmático.



Os mecanismos detalhados estão descritos no texto.
 Fonte: Cnop (2010) (43).

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

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

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

1.4 Estimulação crônica do GPR40

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

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

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

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

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

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

1.5 Espécies reativas de oxigênio

1.5.1 Enzima NADPH oxidase (estrutura e funcionalidade)

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

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

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

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

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

1.5.2 Ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio

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

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

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

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

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

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

VAS2870 é um inibidor da NADPH oxidase recém-sintetizado que age por mecanismos ainda desconhecidos (64). Em um estudo com células endoteliais, o

aumento de espécies reativas de oxigênio na presença de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada foi revertido após incubação na presença de VAS2870 por duas horas (65). Em outro estudo a incubação de células musculares lisas vasculares com 10 μ M e 20 μ M de VAS2870 aboliu completamente a geração de espécies reativas de oxigênio pela enzima NADPH oxidase (66).

1.5.3 NADPH oxidase e estresse de retículo endoplasmático

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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