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

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.

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).

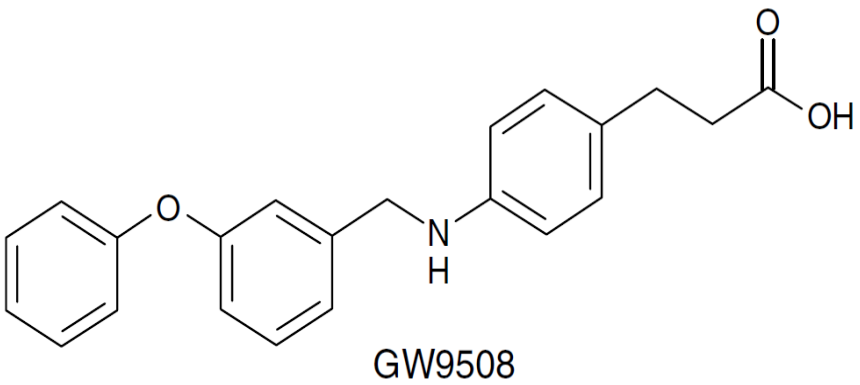

Figura 1. Estrutura química do GW9508, agonista do receptor de membrana GPR40.
FONTE: Briscoe e colaboradores (36)

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.

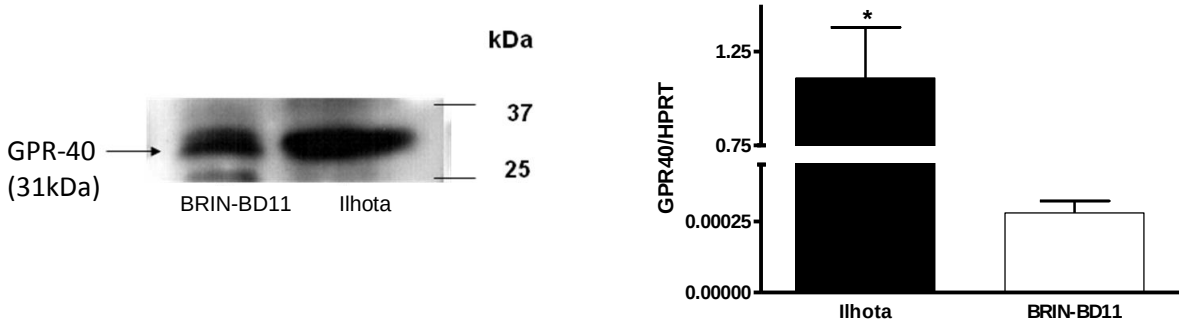

Figura 2. Expressão proteica e gênica do GPR40 em células BRIN-BD11.
Em (A) está representado uma ilustração de Western Blotting e em (B) está representado o resultado da análise de expressão gênica, realizados em células BRIN-BD11 e ilhotas pancreáticas, mostrando que essas células expressam e traduzem 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 ι/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).

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.