Arnaldo Henrique de Souza

**Modulação redox, função e sobrevivência de células β -pancreáticas:
evidência sobre o papel da enzima NADPH oxidase-2(NOX2) em um
modelo *in vitro* de glicotoxicidade**

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

São Paulo
2016

Arnaldo Henrique de Souza

**Modulação redox, função e sobrevivência de células β -pancreáticas:
evidência sobre o papel da enzima NADPH oxidase-2(NOX2) em um
modelo *in vitro* de glicotoxicidade**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Professor Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Versão Original

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

de Souza, Arnaldo Henrique.

Modulação redox, função e sobrevivência de células-beta pancreáticas: evidência sobre o papel da NADPH oxidase-2 (NOX2) em um modelo *in vitro* de glicotoxicidade / Arnaldo Henrique de Souza. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Secreção de insulina.

Versão do título para o inglês: Redox modulation, function and survival of pancreatic beta-cells: evidence on the role of NADPH oxidase-2 (NOX2) enzyme in a model of glucotoxicity *in vitro*.

1. Ilhotas de langerhans 2. Insulina 3. NADPH oxidase-2 (NOX2) 4. Apoptose I. Carpinelli, Prof. Dr. Angelo Rafael II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB033/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Amaldo Henrique de Souza.

Título da Tese: Modulação redox, função e sobrevivência de células-beta pancreáticas: evidência sobre o papel da NADPH oxidase-2 (NOX2) em um modelo *in vitro* de glicotoxicidade .

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **202** nas fls. **116** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Angelo Rafael Carpinelli**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos hiperglicemia e Hiperlipidemia sobre a secreção de insulina e atividade da NAD(P)H oxidase em ilhotas pancreática*" do qual participam o(s) aluno(s) **Arnaldo Henrique de Souza, Daniel Simões de Jesus, Gabriela Nunes Marsiglio, Eloisa Vilas Boas** e os pesquisadores, **Maria Fernanda Rodrigues Graciano, Letícia Prates Roma**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **05.03.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 12 de março de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram direta e indiretamente para o encerramento deste ciclo da minha trajetória acadêmica. Mas, antes dos agradecimentos, quero primeiramente me desculpar com aquelas que participaram desta minha conquista e, por descuido ou esquecimento, não estiverem aqui.

Inicialmente, quero agradecer à minha família por estar sempre me apoiando e incentivando. Por mais que eles não me digam, sei que não entendem direito porque escolhi questionar/investigar/pesquisar essa tal de Fisiologia. Em especial, quero agradecer à minha mãe Clotilde Haurefzskow de Souza, que sempre será um exemplo de vida para mim e, também, a minha irmã Paula Francielle de Souza, que me ajudou em diversos momentos.

À minha noiva Indira, por estar sempre ao meu lado no dia-a-dia, me aconselhando, tranquilizando, ensinando e principalmente, aproveitando cada momento de nossas vidas. Você tem o meu amor, carinho e respeito.

Às universidades de São Paulo (USP) e *catholique de Louvain* (UCL), e aos institutos de Ciências Biomédicas (ICB) e *recherche expérimentale et clinique* (IREC), que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho e minha formação acadêmica.

Aos professores Angelo Rafael Carpinelli e Jean-Christophe Jonas, por terem me recebido de como aluno e pela paciência em ensinar e também ouvir.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Laila, Hilton, Leticia, Chloé, Jean-Philippe, Ana, Daniel, Eloísa, Maíra, Camila, Maria Fernanda e Gabriela, pela amizade, ideias, companheirismo, auxílio e divisão de bancada. Ainda a todos os colegas de laboratórios vizinhos pelo convívio agradável dentro e fora dos corredores.

Aos professores da USP e UCL, em especial do departamento de Fisiologia e Biofísica, que colaboraram para a minha formação acadêmica e por transmitirem suas experiências didáticas e científicas.

Aos funcionários e técnicos: Denis, Fabian, Vilson, Roberto, Maria, Miguel e Cláudio, pelo apoio técnico de extrema qualidade, seriedade e simpatia de cada um. Aos funcionários da biblioteca, pela paciência, profissionalismo e todo o apoio na formatação desta tese. Aos secretários Paloma e José Maria, pela competência, profissionalismo e por todo apoio nos trâmites administrativos.

Aos meus amigos: Leonardo, Augusto, Ariclécio, Marcos, Patrícia, Amanda, Lucas, Talita, Emídio, Felipe, Kami, Rodrigo, Vinicius, Nizar, Jean e os Brunos, pela amizade, paciência, convívio e companheirismo. Ao casal Raquel e Athayde, e também, ao meu “bro” Michel, por me receberem e dividirem tantas alegrias em nosso convívio diário. Com todos vocês aprendi muito sobre convivência, amizade e até ciência.

E por fim, mas, não menos importante, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processos: 2011/21299-9 e 2013/18232-5), pelo suporte financeiro que foi imprescindível para a realização deste trabalho e o meu doutoramento.

“Quem sabe tudo, é porque anda muito mal informado”
Millôr Fernandes

RESUMO

de Souza, AH. Modulação redox, função e sobrevivência de células- β pancreáticas: evidência sobre o papel da enzima NADPH oxidase-2 (NOX2) em um modelo *in vitro* de glicotoxicidade. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Embora o estresse oxidativo causado pelo desequilíbrio redox, favorecido por elevadas concentrações de glicose, seja tipicamente associado com a diminuição da massa funcional de células- β em pacientes com diabetes do tipo 2 (DT2), também tem sido proposto que as espécies reativas de oxigênio desempenham um importante papel na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) em células- β pancreáticas. Neste contexto, a enzima NADPH oxidase-2 (NOX2) tem sido associada tanto com a modulação redox e secreção de insulina, quanto, com danos a células β em condições diabéticas. No entanto, em grande parte dos estudos não se avalia o impacto da inativação/deficiência da NOX2 sobre os efeitos tóxicos da glicose (glicotoxicidade) em células β . No presente estudo, testamos o papel da NOX2 sobre a oxidação de tióis citosólicos, concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), função e apoptose em células β de camundongos simulando uma condição de glicotoxicidade. Para isso, ilhotas de camundongo C57BL/6J nocautes ou não para NOX2 (NOX2-KO e controle-selvagem [WT], respectivamente) foram isoladas e cultivadas por até 3 semanas em 10 ou 30 mmol/l de glucose (G10 e G30, respectivamente). Após 1-2 dias de cultura em concentrações intermediárias de glucose (G10), a secreção de insulina foi maior nas ilhotas NOX2-KO vs. WT sem apresentar diferenças de NAD(P)H e do influxo intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$). Além disso, a deficiência de NOX2 não apresentou mudanças sobre o potencial redox da glutathione citosólica (E_{GSH}), que, aliás, reduz em resposta ao estímulo agudo com G30. A cultura contendo G10 mostrou-se uma condição ótima para o cultivo de ilhotas. Nela, a oxidação de tióis, concentração de H_2O_2 e a apoptose de células β mantiveram-se baixos tanto nas ilhotas NOX2-KO, quanto WT. Em G10, os parâmetros metabólicos (NAD(P)H e $[Ca^{2+}]_i$) e funcionais (GSIS) foram igualmente preservados em ambos os tipos de ilhotas, com exceção de uma redução progressiva da diferença de GSIS entre ilhotas NOX2-KO e WT. Diferentemente de G10, o cultivo de ilhotas em G30 aumenta a concentração de H_2O_2 e a oxidação de tióis no compartimento citosólico. Posteriormente a isso, com exceção da resposta máxima do $[Ca^{2+}]_i$, o cultivo prolongado em G30 melhora a sensibilidade do NAD(P)H à glicose, preservando a reposta máxima de GSIS, mas aumenta a apoptose de células- β . Estas respostas foram quase idênticas em ambos os tipos de ilhotas. Em conclusão, a NOX2 regula negativamente a secreção de insulina em ilhotas de camundongos, mas não é um componente crítico para a sobrevivência de células- β em um modelo *in vitro* de glicotoxicidade.

Palavras-chave: Ilhotas de Langerhans. Insulina. Célula- β . roGFP. Secreção de insulina. Apoptose. NADPH oxidase. NOX2.

ABSTRACT

de Souza, AH. Redox modulation, function and survival of pancreatic β -cells: evidence on the role of NADPH oxidase-2 (NOX2) enzyme in a model of glucotoxicity *in vitro*. [PhD thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Although oxidative stress caused by chronic redox imbalance favoured by high glucose concentrations is typically associated to the decline of the functional β -cell mass in type 2 diabetes (T2D), it has also been proposed that reactive oxygen species play an important role in the glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) by pancreatic β -cells. In this context, the NADPH oxidase-2 (NOX2) enzyme has been associated with redox modulation, regulation of insulin secretion, and β -cell damage in diabetic conditions. However, most of the studies did not address the impact of NOX2 inactivation/deficiency on β -cell glucotoxicity. In the present study, we tested the impact of NOX2 deficiency on islet-cell glucose responsiveness, cytosolic thiol oxidation, hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration, β -cell function and apoptosis in mouse islets under glucotoxicity condition. For this purpose, NOX2 knockout (NOX2 KO) and wild type (WT) C57BL/6J mice islets were isolated and cultured up to 3 weeks at 10 or 30 mmol/l glucose concentrations (G10 and G30, respectively). After 1-2 days of culture at intermediate glucose concentration (G10), the GSIS was higher in NOX2-KO vs. WT islets despite similar rises in NAD(P)H and intracellular calcium influx ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Furthermore, the NOX2 deficiency does not change the cytosolic glutathione-redox potential (E_{GSH}), which decrease upon acute G30 stimulation. The culture at G10 is optimal for islet *in vitro* studies. In this condition, cytosolic thiol oxidation, H_2O_2 concentration and β -cell apoptosis remained low in NOX2-KO and WT islets. At G10, the glucose-induced rises in NAD(P)H, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and GSIS were similarly preserved in both islet types, except for a progressive reduction of the difference in GSIS between NOX2-KO and WT islets. In contrast to G10, the culture at G30 increases the H_2O_2 concentration and cytosolic thiol oxidation. Subsequent to that, except for maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response, long-term culture in high glucose increases the glucose sensitivity of the NADPH, preserving the maximal GSIS but increase the β -cell apoptosis. These responses were almost identical in both types of islets. In conclusion, NOX2 is a negative regulator of GSIS in C57BL/6J mouse islets, but is not a critical component for β -cell survival in a model of glucotoxicity *in vitro*.

Keywords: Islets of Langerhans. Insulin. β -cell. roGFP. Insulin secretion. Apoptosis. NADPH oxidase. NOX2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Funcionamento da cadeia transportadora de elétron mitocondrial.....	14
Figura 2 – Mecanismo de secreção de insulina estimulada pela glicose	15
Figura 3 – Ativação da NOX2 em fagócitos.	17
Figura 4 – Esquema da degradação enzimática de ERO.....	19
Figura 5 – Biossensores roGFP2 para E_{GSH} e H_2O_2	23
Figura 6 – Ilhotas isoladas expressando a sonda GRX1-roGFP2.....	30
Figura 7 – Secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas WT e NOX2 KO.....	34
Figura 8 – Responsividade do NAD(P)H à glicose em ilhotas WT e NOX2 KO.....	35
Figura 9 – Responsividade do cálcio à glicose em ilhotas WT e NOX2 KO.....	36
Figura 10 – Efeitos da glicose sobre a oxidação da sonda GRX1-roGFP2 em ilhotas WT e NOX2 KO	37
Figura 11 – Efeitos da glicose sobre a oxidação da sonda GRX1-roGFP2 após exposição a baixa concentração de H_2O_2	38
Figura 12 – Efeitos da glicose sobre a oxidação de DHE e secreção de insulina em ilhotas WT e NOX2-KO ex vivo.....	41
Figura 13 – A deficiência de NOX2 não tem repercussão sobre a fluorescência de roGFP1 em ilhotas de camundongos cultivadas em diferentes concentrações de glicose	43
Figura 14 – A ausência de NOX2 não altera a fluorescência de roGFP2-Orp1 em ilhotas cultivadas em alta glicose.....	44
Figura 15 – Ausência de NOX2 não afeta a responsividade de NAD(P)H à glicose alterada após uma semana de cultura em diferentes concentrações de glicose.....	46
Figura 16 – A deficiência de NOX2 não afeta a responsividade do cálcio à glicose alterada após uma semana de cultura em diferentes concentrações de glicose.....	46
Figura 17 – A deficiência de NOX2 não tem efeito sobre as alterações de secreção estática de insulina induzidas após uma semana de cultura em alta glicose.....	48
Figura 18 – Falta de impacto da deficiência de NOX2 sobre a resposta de ilhotas à glicose após cultura prolongada em glicose	50
Figura 19 – Ausência de NOX2 não modifica a secreção de insulina durante cultura prologada em alta glicose.	51
Figura 20 – Deficiência de NOX2 não melhora a sobrevivência de células β após cultura prolongada em alta glicose.....	52
Figura 21 – Expressão da sonda p47-roGFP2 em células MIN6	63
Figura 22 – Expressão da sonda p47-roGFP2 em células INS-1E	63
Figura 23 – Efeitos do tratamento crônico com PMA e da ausência de NOX2 sobre a oxidação de tióis em ilhotas de camundongos.....	64
Figura 24 – Imagens representativas dos efeitos da glicose sobre a oxidação de DHE em ilhotas WT e NOX2-KO ex vivo	64

Figura 25 – Imagens representativas de apoptose em células β após cultura prolongada em alta glicose	65
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ²⁺] _i	influxo de cálcio	roGFP	<i>reduction oxidation-sensitive green fluorescent protein</i>
AMPc	adenosina monofosfato cíclico	rxYFP	<i>redox-sensitive yellow fluorescent protein</i>
AT-2	aldritiol-2 ou <i>aldrithiol-2</i>	SH	sulfidrila (ou <i>sulfhydryl</i>)
BSA	albumina (<i>bovine serum albumin</i>)	SOD	superóxido dismutase
CAT	catalase	SS	ponte dissulfeto
DCFH	<i>dichlorofluorescein</i>	STZ	<i>streptozotocin</i>
DHE	dihidroetídeo	T2D	<i>type 2 diabetes</i>
Dz	diazóxido (ou <i>diazoxide</i>)	TCA	<i>tricarboxylic acid cycle</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>	TRs	tiorredoxinas redutases
E _{GSH}	potencial redox da glutationa	Trxs	tiorredoxinas
EPM	erro padrão da média	VDCC	<i>voltage-depend calcium channels</i>
ERO	espécies reativas de oxigênio	WT	<i>wild type</i>
FADH	flavina-adenina-dinucleotídeo		
FCCP	<i>carbonyl-cyanide-4-trifluoromethoxy-phenylhydrazine</i>		
G(n)	concentração de glicose		
G-6-P	glicose-6-fosfato		
Glut2	<i>glucose transporter 2</i>		
GPx	glutaciona peroxidase		
GR	glutaciona redutase		
Grx1	glutarredoxina-1		
Grxs	glutarredoxinas		
GSH	glutaciona (reduzida)		
GSIS	<i>glucose-stimulated insulin secretion</i>		
GSSG	glutaciona (oxidada)		
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio		
HO [•]	hidroxila		
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>		
K30	30 mmol/l de potássio		
K _{ATP}	canais sensíveis à ATP		
KO	nocaute (ou <i>knockout</i>)		
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo		
NADPH	nicotinamida-adenina-fosfato		
NOX	NADPH oxidase		
NOX2	NADPH oxidase-2		
O ₂ ^{•-}	superóxido		
Orp1	<i>oxidant receptor peroxidase-1</i>		
PDH	piruvato desidrogenase		
PKA	<i>protein kinase A</i>		
Prxs	peroxirredoxinas		

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais	28
3.2 Isolamento das ilhotas pancreáticas	28
3.3 Plasmídeos e Geração de Adenovírus	28
3.4 Infecção adenoviral	29
3.5 Condições experimentais: perfusão	29
3.6 Medidas dinâmicas de fluorescência	29
3.7 Medidas de NAD(P)H	30
3.8 Medida do influxo de cálcio	30
3.9 Secreção estática de insulina	31
3.10 Oxidação de dihidrotídeo	31
3.11 Apoptose celular	31
3.12 Análise estatística	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	62
Apêndice A – Experimentos testes e imagens ilustrativas	63
ANEXOS	66
Anexos A – Artigos em submissão	67

1 INTRODUÇÃO

Em 1869 o cientista alemão Paul Langerhans (1847-1888) descreveu pela primeira vez que o pâncreas era constituído por estruturas com características internas distintas. Na época, segundo ele, essas estruturas pareciam ilhas espalhadas por toda a glândula e apresentavam diferenças na coloração e na inervação em comparação com outras regiões do próprio tecido (1). Anos mais tarde essas “ilhas” foram denominadas ilhotas de Langerhans (ou *islets of Langerhans* em inglês) e correspondiam à aproximadamente 1-2% da massa total do pâncreas.

Com o avanço da Endocrinologia descobriu-se que as ilhotas pancreáticas são constituídas de diversos tipos celulares e que secretam uma variedade de hormônios utilizados no controle do metabolismo energético corporal. Nesse contexto, as células β -pancreáticas desempenham papel crucial. Elas são responsáveis por produzir e liberar insulina, principalmente após as refeições, para impedir que os níveis de glicose se elevem acima da faixa de normalidade (entre 10 e 15 mmol/l de glicose). A persistência elevada ou aumentos frequentes acima desta faixa, podem levar ao mau funcionamento e até a morte em diversos tipos celulares, inclusive nas que secretam insulina. Consequentemente, falhas no funcionamento ou na quantidade de células β , podem levar ao desenvolvimento do diabetes *mellitus*, uma doença metabólica caracterizada por elevados níveis de glicose no sangue.

A secreção de insulina pelas células β depende de um conjunto complexo de fatores nutricionais, neurais e hormonais. Dentre eles, a glicose é reconhecida como o fator mais importante para a função e sobrevivência destas células. O processo secretório por outros nutrientes, como ácidos graxos, por exemplo, acontece somente na presença de níveis estimulatórios de glicose (2).

O início da secreção de insulina pela glicose (GSIS – *glucose-stimulated insulin secretion*) ocorre pelo transporte do nutriente para o interior da célula β , por uma proteína integral de membrana denominada Glut2 (*glucose transporter 2*). O Glut2 possui elevado K_m (entre 15 e 20 mmol/l) permitindo que a entrada de glicose seja proporcional ao aumento da glicemia (3). Após entrar na célula, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P) predominantemente pela enzima hexoquinase IV (glicoquinase) de baixa afinidade (K_m entre 6 a 11mmol/l). O destino metabólico preferencial da G-6-P na célula β é a glicólise. Contudo,

estudos apontam que a via das pentoses-fosfato é importante para o fornecimento do cofator dinucleotídeo de nicotinamida-adenina fosfato na forma reduzida (NADPH) (4, 5).

O processo secretório continua quando o piruvato, produto final da glicólise, é transportado à mitocôndria, onde é convertido a acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase (PDH). Subsequentemente, a acetil-CoA entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA - *tricarboxylic acid cycle*), levando ao aumento dos agentes redutores: nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH). Esses agentes são os doadores de elétrons que serão transferidos para a cadeia transportadoras de elétrons mitocondrial. Nela, uma série de reações redox (redução e oxidação, ou oxirredução) faz com que os elétrons provenientes da metabolização de glicose contribuam na síntese de adenosina trifosfato (ATP), finalizando a respiração celular (Figura 1).

Figura 1 – Funcionamento da cadeia transportadora de elétron mitocondrial. Fonte de Handy e Loscalzo (2012).

A síntese de ATP aumenta a relação ATP e adenosina difosfato (ATP/ADP) no citosol, sinalizando o fechamento dos canais para potássio sensíveis à ATP (K_{ATP}) na célula β . Na sequência, ocorre a despolarização da membrana plasmática e a ativação dos canais para cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem (VDCC – *voltage-depend calcium channels*) (6, 7). Em seguida, há o aumento no influxo de Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i, que ativa a exocitose dos grânulos de insulina (8, 9) (Figura 2). Este último processo - despolarização da membrana, abertura de canais VDCC, aumento no [Ca^{2+}]_i e exocitose, é reconhecido como mecanismo de gatilho da secreção de insulina (*the triggering pathway*). Modelos experimentais e condições não-fisiológicas são frequentemente utilizados como recursos para modular este mecanismo de gatilho. Por

exemplo, altos níveis extracelulares de potássio (30 mmol/l [K30]) e fármacos que modulam a atividade dos K_{ATP} (diazóxido ou sulfoniluréias), modulam a exocitose de insulina.

Figura 2 – Mecanismo de secreção de insulina estimulada pela glicose. Imagem adaptada de Torres et al (2009).

Dentre os vários metabólitos produzidos na respiração celular, há um grupo de intermediários reativos, que tendem a reagir com outros elementos químicos (moléculas) para adquirir configuração mais estável, que podem escapar do seu sítio de produção. Além de energia (ATP) e moléculas de água (H_2O), a cadeia transportadora de elétrons produz também radicais livres, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Figura 2) (10). Por definição, radicais livres são considerados espécies químicas (moléculas, íons) que apresentam elétrons livres (desemparelhados). Essas moléculas possuem diversos níveis de reatividade. Como principais exemplos, podemos citar o radical $O_2^{\cdot-}$ (pouco reativo) e o radical hidroxila ($HO^{\cdot-}$) (muito reativo). Este último, formado a partir da oxidação de metais de transição pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), denominada reação de Fenton, por ser altamente reativo, é o mais danoso dos radicais livres (11). No entanto, nem todas espécies reativas são radicalares, ou seja, possuem elétrons livres em sua última camada.

O H_2O_2 , produto da dismutação do $O_2^{\cdot-}$, é um agente oxidante não radicalar e possui baixa reatividade. Neste sentido, o termo espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS – *reactive oxygen species*) é usado para classificar o conjunto dos produtos intermediários derivados do

oxigênio (11). Todavia, como dito anteriormente, nem toda espécie reativa reage rapidamente com outras moléculas, como o termo sugere. A alta reatividade do radical hidroxila, por exemplo, dificulta a sua interação espaço-temporal (12). Isto é, tende a reagir rapidamente próximo de onde foi formado. O H_2O_2 , por sua vez, possui baixa reatividade e pode difundir-se através de membranas (ou através de canais) (12). Dessa forma, ele pode reagir com outras moléculas, mas não necessariamente no local onde foi produzido. Mais adiante veremos o que isso pode repercutir para uma célula.

Com o passar das décadas também foram sendo descobertas novas fontes de geração de radicais livres e oxidantes. Em 1973, foi descoberto que fagócitos continham uma enzima que consumia praticamente todo o oxigênio para formar o ânion O_2^- (13). Em 1999, esta enzima foi identificada em células não-fagocíticas (14, 15). Quatro anos mais tarde (2003), nosso grupo identificou-a também em ilhotas de ratos (16). Posteriormente, foi identificada em células β de roedores e humanos (17-19). Hoje, além da enzima descoberta, sabe-se que espécies redox podem ser formadas em outros locais e compartimentos celulares. Como exemplos, podemos citar os peroxissomos e o retículo endoplasmático (20).

A enzima em especial, citada no parágrafo anterior, é na verdade um complexo enzimático denominado NADPH oxidase (NOX). A enzima NOX é especializada em produzir o radical O_2^- , pela transferência de um elétron do NADPH citosólico para a molécula de oxigênio (21). O O_2^- formado pode ser convertido a H_2O_2 , uma espécie reativa mais estável, pela enzima superóxido dismutase (SOD). Posteriormente, foram descobertas outras subunidades homólogas da NOX, ou seja, uma família de NADPH oxidases (21).

Dentre as NADPH oxidases, a NADPH oxidase-2 (NOX2) é uma das principais e mais bem caracterizadas. A NOX fagocítica é uma enzima-multicomponente distribuída entre a membrana (sítio catalítico) e o citoplasma. Os componentes de membrana incluem as subunidades $\text{gp91}^{\text{phox}}$ e p22^{phox} (*phox* corresponde a *phagocyte oxidase*), geralmente conhecidos como NOX2. As subunidades p40^{phox} , p47^{phox} , p67^{phox} e GTPases Rac (Rac1 ou Rac2, dependendo do tipo celular e da espécie) são citosólicas, ao qual translocam-se para a membrana após ativação da enzima (22). Aliás, sua ativação é altamente regulada. Ela ocorre quando há fosforilação da p47^{phox} em diversos resíduos de serina (21, 23). A interação dos

componentes citosólicos com os de membrana é mediada pela $p22^{phox}$, possibilitando a ativação da NOX2 pela $p67^{phox}$ (Figura 3) (24).

Figura 3 – Ativação da NOX2 em fagócitos. Adaptado de Karen Bedard e Karl-Heinz Krause (2007).

Mas, por que existe uma enzima especializada em produzir espécies reativas? Bom, depende! Em fagócitos (monócitos e neutrófilos), sabe-se que a NOX contribui no combate aos micro-organismos invasores. Na presença destes, uma cascata de eventos, denominada fagocitose, é ativada nestas células especializadas. Na fagocitose, o invasor é inserido em compartimentos específicos intracelulares e depois destruído. A ativação da NOX2 e a produção de espécies reativas são fundamentais para essa destruição (25, 26). Foi constatado que humanos e roedores com deficiência de NOX apresentam susceptibilidade a infecções por bactérias e fungos (27, 28). Por outro lado, o papel da NOX em células não-fagocíticas pode depender de diversos fatores, como, o tipo do tecido/órgão/célula que ela é expressa, de qual NOX e também, dos mecanismos de ativação da enzima (30). Nesta perspectiva, os produtos gerados pela NOX podem agir de sinais intracelulares (29), a perturbadores da homeostase redox, podendo causar danos às células (30).

Em relação à célula β -pancreática, o papel da NOX é muito debatido (31). Primeiramente, foi reportado que os produtos gerados pela NOX (especificamente subunidades da NOX2) poderiam contribuir para a secreção de insulina (16, 32). Em seguida, foi proposto que a resposta metabólica induzida pela glicose seria dependente da atividade

da NOX (ou *phagocyte-like* NOX); ou seja, inibindo-se a NOX, prejudica-se o metabolismo e, conseqüentemente, a secreção induzida pela glicose (6, 33). Na contramão desses achados, um estudo mostrou que a ausência da NOX2 não prejudicava o metabolismo, tampouco a resposta secretória de células β . Ao contrário, a deleção genética de NOX2 melhorou a secreção de insulina pela glicose (18). Nesse sentido, a ação inespecífica de inibidores farmacológicos foi associada com o comprometimento não somente da atividade da NOX, mas também de outras vias importantes para a funcionalidade de células β -pancreáticas (18, 34).

Apesar da incerteza sobre o papel da NOX sobre a secreção de insulina, tem sido proposto que, em longo prazo, o aumento da sua atividade estaria relacionado com a citotoxicidade em células secretoras de insulina (31). Os principais moduladores da NOX em células β seriam lipídios (35, 36), citocinas pró-inflamatórias (37, 38) e glicose (18, 39, 40) – todos relacionados com a incidência de distúrbios metabólicos, como obesidade, síndrome metabólica e intolerância à glicose. A permanência ou o não tratamento destes distúrbios pode levar ao desenvolvimento do diabetes do tipo 2 (T2D – *type 2 diabetes*), doença associada à inabilidade da célula β em suprir a demanda aumentada – níveis elevados de glicose.

Em 2011, um estudo mostrou que ilhotas isoladas de ratos ZDF, um modelo animal de diabetes, e ilhotas humanas de diabéticos apresentavam maior “geração de ERO” e expressão proteica dos componentes da NOX2, sugerindo que a atividade da enzima estaria aumentada no diabetes (17). Em outro, a deleção genética da NOX2 protegeu camundongos de se tornarem diabéticos após administração da droga STZ (*Streptozotocin*), que induz a destruição de células β (37). Além destes, outros estudos mostram correlação entre atividade da NOX, dano oxidativo e doenças metabólicas (41, 42), tornando promissor o desenvolvimento de novas formas farmacológicas de inibição da enzima com fins terapêuticos (30, 31, 40).

Mas, se as células possuem diversas fontes de radicais livres e oxidantes, como, então, elas lidam com essas espécies reativas? Esta resposta está diretamente relacionada ao processo evolutivo. A mesma evolução que levou os organismos aeróbios a obterem maior quantidade de energia possível de um nutriente ao preço da geração de ERO e de possuírem uma enzima especializada em atacar micro-organismos invasores, fez com que

desenvolvessem mecanismos sofisticados que detectasse e eliminasse essas espécies redox (Figura 4).

Células β -pancreáticas apresentam relativamente baixa atividade de duas enzimas: i) catalase (CAT) e ii) glutathiona peroxidase (GPx) (ambas, definidas pela expressão gênica e proteica em comparação a outros tecidos) (43-45). Essas enzimas, associadas com outros mecanismos que discutiremos a seguir, são responsáveis por eliminar moléculas oxidantes do sistema biológico. Por isso, também são chamadas de enzimas ou sistemas antioxidantes (11).

O tripeptídeo glutathiona é o sistema principal utilizado na metabolização de altas concentrações de H_2O_2 (46). O mecanismo desse processo acontece quando o grupo tiol glutathiona (GSH – *reduced glutathione*) é oxidado para glutathiona dissulfeto (GSSG – *glutathione disulfide*) e então reduzido de volta a GSH pela enzima glutathiona redutase (GR), utilizando NADPH como cofator (Figura 4) (46). Grupamentos tióis são alvos redox biológicos com papel importante na ação química de diversas enzimas, fatores de transcrição e proteínas regulatórias (47). Além deles e do sistema descrito acima, peroxirredoxinas (Prxs), tiorredoxinas redutases (TRs) e outros grupos tióis, como isoformas de glutarredoxinas (Grxs) e tiorredoxinas (Trxs), também auxiliam na degradação do H_2O_2 e na manutenção da homeostase redox em células β (48-50).

Figura 4 – Esquema da degradação enzimática de ERO. Adaptado de Kalyanaraman (2013).

Com a baixa expressão de enzimas que eliminam o H_2O_2 , associada à presença da SOD, enzima que dismuta $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (43, 44), tem-se o conceito de que a célula β é susceptível aos agentes oxidantes (51). Mesmo com a identificação de um sistema antioxidante sofisticado, o fato de que a célula β responde bem a sobrecarga metabólica contribui para aceitação do conceito de suscetibilidade à ação de espécies reativas (52, 53).

Em outras palavras, a quantidade de glicose extracelular equilibra-se rapidamente com o meio interno, onde é necessariamente metabolizada. Em decorrência disso, assume-se que, com altos níveis de glicose, há também aumento na formação de radicais livres, oxidantes e, conseqüentemente, desregulação da homeostase redox. Contudo, estudos mais recentes indicam que pode não ser bem assim.

Primeiramente, nas últimas décadas, começaram a surgir evidências contrárias à ideia de que radicais livres e oxidantes causariam apenas danos para as células. Há casos em que, quando produzidas em processos fisiológicos, algumas espécies reativas podem atuar como sinalizadores em eventos intracelulares (5, 54). Isto é, pequenos aumentos transitórios de espécies redox seriam ocasionados fisiologicamente em resposta a vários fatores, como, por exemplo, metabólico, neural e inflamatório, sem causarem desarranjo redox ou dano celular (55). A espécie reativa mais cotada como sinalizadora intracelular é o H_2O_2 . Além de ser uma molécula pequena e difusível, ela possui alguns requisitos de um bom sinalizador: tanto a sua síntese, quanto a eliminação, são reguláveis; e possui alvos redox específicos (12). Nessa linha de raciocínio, foi proposto que as ERO contribuiriam no processo de secreção de insulina induzido pela glicose (54). Vejamos como.

Além do mecanismo de secreção descrito anteriormente – fechamento dos K_{ATP} , despolarização da membrana, aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e exocitose dos grânulos de insulina (Figura 1), há uma via metabólica alternativa que opera de forma complementar ao processo secretório de gatilho induzido pelo Ca^{2+} . Foi descoberto que fatores de acoplamento produzidos pelo metabolismo de nutrientes, hormônios e neurotransmissores podem amplificar a exocitose induzida pelo Ca^{2+} (56, 57). Isto é, sinais alternativos produzidos pelo metabolismo aumentam a exocitose de insulina, mesmo em condições experimentais com os níveis intracelulares de cálcio inalterados ou maximamente elevados. Esse fenômeno é chamado de via de amplificação da secreção de insulina (*Metabolic amplifying pathway*) (Figura 1).

Embora os mecanismos envolvidos na amplificação ainda permaneçam desconhecidos, existem candidatos metabólicos que podem contribuir no sinal de exocitose (56-58). Alguns exemplos, são: cofatores metabólicos, como, o NADPH e, também, alterações redox induzidas por radicais livres e oxidantes (54, 59). Nota-se que estamos falando do controle redox da exocitose (59). Dentre as espécies redox candidatas, novamente, o

candidato principal seria o H_2O_2 por sua propriedade físico-química, descrita anteriormente. Porém, alguns estudos debatem o papel de ERO sobre a secreção de insulina. Vejamos.

Em um estudo, observou-se que a glicose, agudamente, induz a oxidação do composto químico DCFH (*Dichlorodihydrofluorescein*), refletindo o possível aumento de peróxido de hidrogênio (54). Em outro, foi observado o mesmo efeito agudo da glicose, mas na produção do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, obtido pela oxidação da sonda DHE ou HE (dihidroetídeo ou *dihydroethidium*) (60). Em ambos, os autores concluíram que o aumento de ERO é um mecanismo de sinalização para a exocitose, contribuindo para a hipótese da ativação da NOX como parte do processo de secreção de insulina em ilhotas de ratos (40). Contudo, os efeitos da glicose sobre a geração de ERO ou na modulação do estado redox são bastante controversos. Outros estudos mostram que o aumento na geração/conteúdo de $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$, ocorre em baixas concentrações, ou na ausência do nutriente (55, 59, 61, 62). Parte dessas controvérsias (modulação redox pela glicose e a função da enzima NOX em células β) pode estar relacionada aos métodos utilizados para medir a geração, a localização dessas espécies reativas ou, como já vimos, dos meios de inibição da NOX.

Apesar dos avanços, a maioria dos estudos com célula β envolvendo alterações redox e a enzima NOX, utilizam os termos “produção/conteúdo de ERO” para descrever os produtos gerados pela oxidase. Isto ocorre porque os dados da atividade da NOX e as mudanças no estado redox, são obtidos, quase que exclusivamente, pelo uso de sondas fluorescentes químicas. Parte destas sondas consiste de moléculas químicas solúveis que se encontram no estado reduzido e não-fluorescente; e quando penetram nos tecidos/células, essas moléculas se tornam fluorescentes após oxidação (11). Esse tipo de sonda, reconhecida como convencional ou clássica, é amplamente usada como “sensor de ERO” e/ou para medir o “estado redox celular” (63). O uso destes compostos, por outro lado, é muito questionado quando não acompanhado por outras técnicas mais precisas ou por controles adequados (63). Além do que, há evidências recentes de que a oxidação de alguns tipos de sensores não é específica, como proposto inicialmente. Vejamos dois exemplos.

A oxidação da sonda DCFH, proposta como específica para o H_2O_2 , além de ser irreversível, pode ser mediada pela atividade de peroxidases, lipoxigenases (64) e pelo íon ferro (65). Esta sonda é sensível à foto-oxidação e pode também difundir-se para fora da célula

ou ser removida por transportadores de membrana (66), dificultando a interpretação de sua oxidação *in situ*.

A DHE ou HE, uma outra sonda química irreversível e reportada como específica para o $O_2^{\cdot -}$ (67), também tem suas limitações. Além de ser 10 x mais fotossensível do que DCFH (68) e de também ser oxidada por peroxidases (69), seu “padrão-ouro” depende do equipamento HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) para separar e identificar o produto que reagiu com o radical livre (70). Para utilização deste e outros métodos mais precisos, a identificação-quantificação da espécie redox requer lise (quebra) celular. Isto é, a separação de todos compartimentos celulares. Mesmo tomando os cuidados devidos, com a quebra celular podem ocorrer oxidações, diferenças na pressão de O_2 e aumento na formação de espécies reativas (11).

Para tentar ilustrar a complexidade destes processos, vamos imaginar um modelo de estresse e modulação do estado redox: o que aconteceria a uma célula se a privássemos do seu principal suprimento energético por um determinado tempo – digamos, por alguns minutos? Será que haveria alterações, no estado redox, provenientes do aumento de ERO? Se sim: quais espécies? Em qual sítio de geração de ERO (mitocôndria, retículo endoplasmático, NOX...)? Qual sistema antioxidante poderia atuar? Caso fosse em apenas um sítio de produção, seria suficiente para induzir mudanças no estado redox celular?

Embora significativo progresso tenha ocorrido com o uso de sondas convencionais e lise celular, essas ferramentas ainda não nos permitem avaliar precisamente os processos redox *in vivo* – que ocorrem de forma rápida, dinâmica, seletiva e compartimentalizada, ou seja, que respondam adequadamente as questões acima. Sendo assim, novas ferramentas precisavam e foram desenvolvidas. Dentre elas, vamos nos ater a uma em especial, que está revolucionando a forma de entender biologia redox por radicais livres e oxidantes (71). São as proteínas fluorescentes redox-sensitivas geneticamente codificadas.

Esse tipo de sonda redox foi desenvolvido a partir de modificações genéticas em proteínas fluorescentes já conhecidas. Foi adicionado um par de resíduos de cisteína, aminoácido que possui um grupo tiol na sua cadeia lateral (SH – sulfidrila ou *sulfhydryl*) e é facilmente oxidado, formando uma ponte dissulfeto (SS – ou *disulfide bridge*) (11). A formação dessa ponte altera as propriedades de fluorescência da proteína, permitindo, assim, a determinação do estado redox do par ditiol-dissulfeto (72).

Essa classe de biossensores foi desenvolvida a partir de dois tipos de proteínas fluorescentes: i) rxYFP – *redox-sensitive yellow fluorescent protein* e; ii) roGFP – *reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein*. Dentre estas, as sondas roGFP (roGFP1 e roGFP2) têm se destacado mais em estudos de organismos multicelulares. Basicamente, as sondas roGFP contêm dois espectros de excitação máxima inversos (λ_{ex} 405 e 480 nm) que permitem a sua mensuração de forma ratiométrica e independente da concentração dentro das células (Figura 5B) (73). Além disso, sensores roGFP são resistentes a perturbações por mudanças do pH dentro de uma escala fisiológica (pH 5,5 – 8,0) (63).

Figura 5 – Biossensores roGFP2 para E_{GSH} e H_2O_2 . Fonte Dick e Morgan (2015).

Vejamos um exemplo de comparação entre sondas redox criadas a partir dois tipos de proteínas citados acima. Um estudo conduzido em células β pancreáticas de ratos concluiu que pode haver confusão na interpretação dos dados obtidos com a sonda mito-Hyper, sensível a H_2O_2 e desenvolvida a partir de rxYFP, por causa do pH intracelular (61). Mudanças no pH mitocondrial, induzidas pela glicose, apresentaram efeito oxidante sobre a oxidação do biossensor – o que foi completamente oposto ao observado com a sonda mito-roGFP1 (redução na oxidação do sensor). Esta última, por sua vez, não apresentou mudanças significativas na fluorescência em resposta a variações fisiológicas do pH (61). Nesse sentido, foi sugerido que: para melhor compreensão dos dados obtidos com a sonda Hyper, sejam

conduzidos experimentos controle com sensores de pH; e que a sonda mito-roGFP1 refletia mudanças no estado redox de tióis mitocondriais induzidas pela glicose (61).

Apesar das diferenças, os biossensores expressos dentro das células, predominantemente (se não exclusivamente), se equilibram com o par redox de glutatona (GSSG/2GSH)(72). Posteriormente, observou-se que este equilíbrio é dependente da presença de Grxs endógenas (74). Assim, Grx1 humana foi então adicionada ao sensor roGFP2 (Grx1-roGFP2) para medir o potencial redox da glutatona (E_{GSH}) (Figuras 5A e C)(74).

Subsequentemente à criação do sensor Grx1-roGFP2, reconheceu-se que, quando acoplados diretamente a outras enzimas redox, os roGFP poderiam responder a outras espécies redox (63). Em 2009, a fusão genética entre uma peroxidase (Orp1 – *oxidant receptor peroxidase 1*) e um roGFP2 criou a sonda roGFP2-Orp1, sensível a H_2O_2 (75). Para criar este sensor de H_2O_2 , digamos que foi “emprestado” o conceito, encontrado na natureza, de troca entre tióis de peroxidases, Grxs, Trxs ou proteínas-alvo específicas. Em outras palavras, a ideia-chave foi mimetizar a transmissão: H_2O_2 – Orp1 – proteína-alvo por H_2O_2 – Orp1 – roGFP2 (Figuras 5A e C)(63, 76).

Não vamos nos esquecer do modelo experimental proposto anteriormente e das questões levantadas: privação energética e alterações no estado redox.

Na verdade, esses experimentos foram recentemente realizados em células β -pancreáticas de ratos e ilhotas humanas. Foram conduzidos de forma dinâmica, medindo alterações redox de tióis com sensores roGFP, em tempo real e em um determinado compartimento de células vivas e intactas (61, 77, 78). Um destes estudos mostrou que glicose e outros nutrientes podem modular o E_{GSH} na matriz mitocondrial em poucos minutos (entre 5 e 10 min). A remoção de glicose aumentou rapidamente o E_{GSH} mitocondrial de células β primárias de ratos e, também, em ilhotas de humanos. A subsequente reposição gradual de glicose rapidamente reverteu o aumento do E_{GSH} induzido pela ausência de nutrientes. Por outro lado, não foram detectadas alterações expressivas do E_{GSH} no compartimento citosólico (78), mostrando que a glicose pode induzir alterações redox dinâmicas, local-específicas e não globais.

Além dos achados citados anteriormente, o que já foi sugerido utilizando sensores roGFP em célula β -pancreática é que i) a exposição crônica à baixa glicose (níveis não

estimulantes) induz desarranjo redox na mitocôndria, mas não no compartimento citosólico (77); e ii) a exposição crônica à alta glicose induz o desequilíbrio redox mitocondrial (79). No caso, desarranjo, ou desequilíbrio, redox foi associado ao aumento crônico na oxidação de tióis e de genes relacionados ao estresse, seguidos de disfunção ou morte destas células.

A relação entre aumento de ERO e toxicidade celular é um fenômeno bem descrito na literatura. Em determinadas situações, os radicais livres e oxidantes podem comprometer a estrutura e a função de biomoléculas. As espécies reativas derivadas do oxigênio podem reagir em determinadas regiões de lipídios, com proteínas importantes ao metabolismo e com o DNA (46). Tais reações podem evoluir para a disfunção e até morte celular. Nesse contexto, o termo estresse oxidativo frequentemente é utilizado para descrever o aumento de ERO devido a um desequilíbrio entre a sua produção (pró-oxidantes) e a capacidade de eliminação (antioxidantes). Isto é, sem uma definição em termos quantitativos. Contudo, como já dito, as espécies redox são rapidamente produzidas e eliminadas. Dependemos do contexto, nem sempre o aumento de oxidantes está associado a um estado de estresse oxidativo, mas, sim, com um mecanismo de sinalização.

Frequentemente utilizados, os termos “estado redox celular”, “produção de ERO celular” e “estresse oxidativo celular” dão a entender que são processos globais, generalizados e que afetam toda a célula/organismo. Parte disso, contudo, dificulta o entendimento dos fenômenos redox induzidos pela glicose sobre a fisiologia de células β e ilhotas pancreáticas. Essa falta de conhecimento pode estar dificultando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que auxiliem na restauração do equilíbrio redox em condições fisiopatológicas.

Partindo do pressuposto que o estresse oxidativo tem um papel importante no declínio da massa funcional de célula β no diabetes, é de se esperar que antioxidantes sejam considerados uma forma promissora de combater o desarranjo redox induzido por radicais livres e oxidantes. Contudo, ao tentar prevenir ou restaurar os danos causados pelo estresse oxidativo, eles foram considerados ineficazes em algumas pesquisas e testes clínicos (80-83). A ineficácia terapêutica pode ou não, estar relacionada com o fato de ainda não sabermos com clareza o papel das espécies reativas sobre manutenção e a fisiopatologia do estado redox em célula β . Por fim, pressupõe-se também que a ausência ou inibição da NADPH oxidase, pode reduzir os efeitos tóxicos da exposição prologada à alta glicose em células- β .

Contudo, esta hipótese continua sendo uma suposição não foi confirmada por experimentos, nem por testes clínicos.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar a função da enzima NOX2 sobre a oxidação de tióis, função e sobrevivência de células β -pancreáticas induzidas pela glicose.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a secreção estática de insulina e a resposta metabólica, induzidas pela glicose, em ilhotas de camundongos nocautes para a enzima NOX2 ou de seus respectivos controles;
- Avaliar as alterações do potencial de glutathiona (E_{GSH}) no compartimento citosólico, induzidas agudamente pela glicose em ilhotas nocautes ou não para NOX2;
- Avaliar a oxidação de tióis citosólicos, a responsividade metabólica à glicose e a secreção estática de insulina, após cultura prolongada em baixa, intermediária ou alta glicose em ilhotas nocautes ou não para NOX2;
- Avaliar a sobrevivência de ilhotas e células β -pancreáticas após cultura prologada na presença de alta ou intermediária concentrações de glicose, em ilhotas nocautes ou não para NOX2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos nocautes (ou *knockout*) para NOX2 (NOX2-KO) pareados com seu respectivo controle C57BL/6J (WT – *wild type*) (Jackson Laboratory - Bar Harbor, MA). Os animais foram mantidos no biotério *Health Science Sector* da *Université catholique de Louvain* (UCL - Bruxelas, Bélgica) livres de agentes patogênicos.

Para experimentos *ex vivo* (recém-isolamento), foram utilizados animais NOX2-KO e seus respectivos *backgrounds* (WT) (Jackson Laboratory), gentilmente cedidos pelo professor Dr. Rui Curi do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

3.2 Isolamento das ilhotas pancreáticas

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UCL (Project 2013/UCL/MD/9/016) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP (202/116/02/2012).

As ilhotas pancreáticas foram isoladas por digestão com collagenase segundo metodologia proposta por Lacy e Kostianovsky (84) e adaptada pelo laboratório. Após o isolamento, as ilhotas foram lavadas 3 x (2 min x 800 RPM, cada) com solução Krebs e separadas por gradiente de concentração Histopaque1077 (Invitrogen) na presença de meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo 10 mmol/l de glicose, sem albumina bovina (BSA). Em seguida, as ilhotas foram lavadas 3 x (2 min X 1000 RPM), coletadas sob um estereomicroscópio e cultivadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 contendo 10 mmol/l de glicose (G10), suplementado com 2 mmol/l de glutamina, 5 g/l de albumina bovina (BSA) e com os antibióticos penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). As ilhotas foram mantidas por até 3 semanas de cultura em meio RPMI contendo diferentes concentrações de glicose. Para experimentos *ex vivo*, as ilhotas foram obtidas conforme metodologia descrita acima, exceto: pelas centrifugações nas lavagens e separação por gradiente de concentração.

3.3 Plasmídeos e Geração de Adenovírus

Plasmídeos expressando o sensor redox roGFP1 foram doados pelo professor Dr. Jim Remington (Universidade de Oregon, EUA). Os sensores GRX1-roGFP2 e roGFP2-Orp1 foram doados pelo professor Dr. Tobias Dick (Heidelberg, Alemanha). Os plasmídeos foram

amplificados em *E.coli* e selecionados pela presença do gene de resistência à Kanamicina ou Ampicilina. Os adenovírus foram então gerados utilizando o sistema AdEasy XL Adenoviral Vector System (Stratagene, La Jolla, CA)(85). Resumidamente, após a digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição específicas, a região de interesse de cada plasmídeo foi inserida no vetor intermediário pShuttle sob controle do promotor CMV. O inserto foi então novamente clonado no vetor adenoviral pAdEasy e os plasmídeos resultantes foram digeridos com Pac1 e transfectados em células HEK293 para a geração de partículas adenovirais. As células HEK293 foram rompidas e os adenovírus liberados e purificados em um gradiente de Cloreto de Césio conforme descrito em (61, 78).

3.4 Infecção adenoviral

Após o isolamento, ou 24 horas de cultura em meio G10, as ilhotas pancreáticas foram infectadas com adenovírus (multiplicidade de infecção: aproximadamente 100) expressando sondas geneticamente codificadas sob controle do promotor CMV.

3.5 Condições experimentais: perfusão

Após cultura, ilhotas WT e NOX2-KO foram perfundidas simultaneamente em fluxo de 1 ml/min com solução de Krebs tamponada com bicarbonato contendo (mmol/l) NaCl (120), KCl (4,8), CaCl₂ (2,5), MgCl₂ (1,2), NaHCO₃ (24), 1 g/l de BSA e várias concentrações de glicose e substâncias a serem testadas, descritas nas legendas dos respectivos experimentos. As soluções foram continuamente gaseificadas com O₂/CO₂ (94/6) para manter o pH aproximadamente em 7,4.

3.6 Medidas dinâmicas de fluorescência

Após cultura, as ilhotas, expressando os sensores roGFP, foram perfundidas e a razão entre os comprimentos de onda (λ_{ex} 400/480 nm; λ_{em} 535 nm) foi monitorada a cada 30 segundos, utilizando câmera EMCCD (Evolve 512, Photometrics, Tucson, AZ) e uma objetiva de 20 x em microscópio invertido. Os resultados foram obtidos pelo programa MetaFluor (Sunnyvale, CA) e normalizados pela razão da fluorescência (λ_{ex} 400/480 nm), medida na presença de 10 mmol/l de ditioneitol (DTT) (definido como 0%), seguida de 100 μ mol/l de aldritione-2 (AT-2) (definido como 100%) (Figura 6).

Figura 6 – Ilhotas isoladas expressando a sonda GRX1-roGFP2. Exemplo de um experimento de perfusão com 6 ilhotas expressando a sonda GRX1-roGFP2 36h após a infecção adenoviral. Os valores são referentes razão (ratio) λ_{ex} 405/480 nm e λ_{em} 535 nm.

3.7 Medidas de NAD(P)H

Após cultura, as ilhotas foram perfundidas com Krebs e a autofluorescência do NAD(P)H (λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 470 nm) foi adquirida a cada 10 segundos e normalizada pelo nível de fluorescência medido na presença de 10 $\mu\text{mol/l}$ de FCCP (*Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*).

3.8 Medida do influxo de cálcio

O fluxo intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) foi medido após 2 horas de incubação com 2 $\mu\text{mol/l}$ da sonda Fura-2 LR (Teflabs). Em seguida, as ilhotas foram perfundidas com Krebs e diferentes concentrações de glicose. A razão da fluorescência de Fura-2 LR (λ_{ex} 340/380 nm; λ_{em} 510 nm) foi adquirida a cada 5 segundos.

3.9 Secreção estática de insulina

Após cultura, ilhotas foram pré-incubadas por 40 minutos em solução de Krebs contendo 0,5 mmol/l de glicose. Grupos de 5 ilhotas foram então incubadas durante 1 hora na presença de várias concentrações de glicose em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂. A concentração de insulina foi medida por radioimunoensaio (RIA - *radioimmunoassay*), utilizando insulina de rato como padrão e normalizada pelo conteúdo de DNA da ilhota, medido por fluorimetria, utilizando o marcador SYBR Green I.

3.10 Oxidação de dihidroetídeo

Após o isolamento as ilhotas foram pré-incubadas durante 30 minutos em solução Krebs contendo 2,8 mmol/l de glicose a 37 °C. Grupos de 15-20 ilhotas foram então incubadas durante mais 1 hora na presença 2,8 ou 16,7 mmol/l de glicose. Em seguida, as ilhotas mantidas por 20 minutos com 100 µmol/l da sonda DHE em temperatura ambiente, protegidas da luz e com agitação constante. Ao final, as ilhotas foram lavadas e transferidas para placas com lamínula para determinação da fluorescência em microscópio confocal (LSM 510 – Axiovert 100M – Carl Zeiss, Jena, Alemanha), com laser de hélio-neônio (λ_{ex} 543 nm; λ_{em} 575 nm). A quantificação da fluorescência foi medida pela projeção das secções utilizando o programa “Image J. 1.46r” (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA) e normalizada por área de ilhota.

3.11 Apoptose celular

Fragmentos de DNA foram mensurados utilizando o kit *Cell Death Detection* ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics), como previamente descrito (86). Após cultura, grupos de 60 ilhotas foram destruídos com tampão de lise (aprox. 100 µl) e centrifugadas (200 *g* x 10 min) para a separação das frações citosólica e nuclear. Os fragmentos de DNA presentes na fração citosólica foram medidos após adição de anti-DNA-peroxidase e de seu substrato. A média da absorbância (405 nm) de cada amostra foi normalizada pelo controle positivo do kit e corrigida por conteúdo de DNA da fração nuclear.

A apoptose de células β foi determinada sobre cortes histológicos de ilhotas (5 µm de espessura), utilizando o kit “*In Situ* Cell Death Detection Kit” (Roche Diagnostics), seguido de imuno-histoquímica para insulina, conforme descrito (79). Resumidamente, após 18 horas de incubação com anticorpo primário *guinea-pig anti-insulin antibody* (1/1000) (Invitrogen,

Eugene, Oregon, EUA) os cortes histológicos foram incubados por 1 hora com o anticorpo secundário Alexa Fluor 494-*conjugated anti-guinea-pig antibody* (Invitrogen, Camarillo, CA, EUA) (1/1000). O núcleo das células foi corado com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (0,75 µg/ml). A porcentagem de apoptose de células-β foi determinada manualmente pela contagem de TUNEL e DAPI, marcados com insulina, sobre imagens digitais obtidas por microscopia de fluorescência (excitação/emissão: TUNEL: 475/540 nm; DAPI: 350/460 nm; insulina: 590/617 nm).

3.12 Análise estatística

Os valores representam média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises estatísticas entre os grupos foram realizadas pelo teste ANOVA *two way*, seguido pela correção de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A secreção de insulina estimulada por glicose ocorre após uma série de eventos metabólicos. A metabolização do açúcar pelas células β , aumenta o metabolismo energético, a produção de vários produtos metabólicos e, em seguida, com a despolarização da membrana plasmática e o influxo intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$), ocorre a exocitose dos grânulos contendo insulina (58, 87, 88). Embora o estresse oxidativo seja tipicamente associado com a disfunção e apoptose das células β pancreáticas, recentemente tem sido proposto que alterações redox mitocondriais, e também via NADPH oxidase, podem ser moduladores da secreção de insulina (40, 89). Para testar essa última hipótese – NOX e modulação de insulina, realizamos experimentos de secreção estática de insulina usando ilhotas de camundongos nocautes para NOX2 (NOX2-KO), pareados com seus respectivos controles C57BL6/J (WT).

Como de se esperar, a glicose marcadamente aumentou a secreção de insulina. Quando comparado com WT, a secreção nas ilhotas NOX2-KO foi estatisticamente maior (Figura 7A-C). Essa diferença foi observada em 20 e 30 mmol/l de glicose quando a secreção foi normalizada pelo conteúdo de DNA ou por número de ilhotas (Figura 7A e C, respectivamente), ou em 30 mmol/l de glicose, quando a secreção foi expressada por porcentagem (%) de conteúdo de insulina inicial (Figura 7B). O conteúdo de insulina não foi diferente entre os grupos (Figura 7D). Esses resultados confirmam que a NOX2 é um modulador negativo da secreção de insulina e pode não estar envolvida na síntese deste hormônio (18).

Figura 7 – Secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas WT e NOX2 KO. Ilhotas foram incubadas 1 h em Krebs contendo diversas concentrações de glicose. Secreção normalizada por DNA de ilhota (A), conteúdo de insulina (B), ou por ilhota (C). Taxa de conteúdo de insulina por DNA de ilhota. Valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. *, $P < 0,05$ efeitos da glicose dentro de cada grupo; #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$ para diferenças entre ilhotas WT e NOX2 KO.

A seguir foi testado se o aumento de secreção nas ilhotas nocautes para NOX2 resultou de possíveis diferenças na estimulação do metabolismo da glicose. É bem sabido que a glicose aumenta rapidamente a concentração de NAD(P)H (NADH e NADPH), cofatores metabólicos e sinalizadores alternativos de exocitose em células β . A deleção genética da NOX2 poderia alterar a produção ou até mesmo o consumo de NADPH, uma vez que ele é um substrato para a atividade da oxidase.

Como mostrado na figura 8, a concentração de glicose aumentou de forma dose-dependente a fluorescência do NAD(P)H, indicando um aumento intracelular dos agentes redutores NADH e NADPH. A resposta máxima deu-se após 30 mmol/l de glicose, semelhantemente à estudos prévios com ilhotas de roedores (90, 91) e humana (78). O efeito

da glicose foi rapidamente inibido após adição de 10 $\mu\text{mol/l}$ de FCCP (*Carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxy phenylhydrazone*), um desacoplador mitocondrial, que foi seguido por uma brusca queda na concentração de NAD(P)H. No entanto, as respostas foram praticamente idênticas entre as ilhotas NOX2-KO e WT, sugerindo que ausência da NOX2 não afeta o aumento de agentes redutores intracelulares, induzido pela glicose.

Figura 8 – Responsividade do NAD(P)H à glicose em ilhotas WT e NOX2 KO. Ilhotas foram perfundidas com Krebs em crescentes concentrações de glicose (Gn em mmol/l, como especificado no gráfico) antes da adição de 10 $\mu\text{mol/l}$ de FCCP. Os dados foram normalizados após estabilização da queda rápida de fluorescência induzida pelo FCCP. Valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

O passo seguinte foi testar se a deficiência de NOX2 poderia afetar a resposta do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à glicose. Estudos prévios reportam que a inibição da NOX, por DPI (6) ou silenciamento da p47^{phox} (33), prejudica o influxo de Ca^{2+} e a exocitose de insulina. Como esperado, a resposta à glicose provocou um aumento concentração-dependente no $[\text{Ca}^{2+}]_i$, apresentando resposta máxima após a perfusão de 30 mmol/l de potássio (K30) extracelular, e na presença continuada de diazóxido (Dz), um ativador dos canais K_{ATP} (Figura 9). No entanto, não foram encontradas diferenças entre as ilhotas WT e NOX2-KO, sugerindo que sinais alternativos podem ser responsáveis pelas diferenças na exocitose de insulina.

Figura 9 – Responsividade do cálcio à glicose em ilhotas WT e NOX2 KO. Ilhotas foram estimuladas aumentando-se a concentração de glicose (G em mmol/l, como especificado no gráfico) em Krebs contendo 4,8 mmol/l de K^+ antes da total despolarização com 30 mmol/l de K^+ na presença de 250 μ mol/l de diazóxido (K30Dz). Valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Mudanças no potencial redox da glutatona pode ser um possível fator de acoplamento metabólico na exocitose em células β . Glutarredoxina (Grx), uma pequena enzima redox que usa GSH como cofator, foi proposta como sendo uma possível mediadora do controle redox da exocitose em células β (59, 92). Além disso, ela também está localizada em domínios subcelulares, tais como o núcleo e grânulos secretores (59). Neste contexto, nos perguntamos se a NOX2 poderia inibir a resposta secretora por afetar a oxidação de GSH. Para testar esta hipótese, utilizamos a sonda GRX1-roGFP2 (não direcionada a nenhum compartimento subcelular), que mede o E_{GSH} e que é um rápido sensor para alterações do equilíbrio redox 2GSH/GSSG (74), para comparar as alterações agudas induzidas pela glicose sobre o E_{GSH} de ilhotas NOX2-KO e WT.

Como mostrado na figura 10, depois de perfusão inicial na presença de 10 mmol/l de glicose, a omissão do nutriente não afetou significativamente a fluorescência de GRX1-roGFP2. Por outro lado, com a estimulação aguda de 30 mmol/l de glicose a fluorescência diminuiu rapidamente indicando que a glicose reduz o E_{GSH} . Em relação aos grupos de ilhotas, não foram registradas diferenças significativas entre WT e NOX2-KO.

Figura 10 – Efeitos da glicose sobre a oxidação da sonda GRX1-roGFP2 em ilhotas WT e NOX2 KO. A, ilhotas expressando fluorescência de GRX1-roGFP2 foram perfundidas com Krebs contendo diferentes concentrações de glicose (Gn em mmol/l) como especificado no gráfico acima. Ao final de cada experimento foi adicionado 10 mmol/l de DTT (0% de oxidação da sonda) e depois 100 μ mol/l de aldritol-2 (AT-2) (100% de oxidação da sonda), na presença de G10, para normalização dos dados; B, representação em barras da figura A. Os valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. **, $P < 0,01$; * $P < 0,05$ para efeito da glicose dentro de cada grupo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Dados anteriores em células β primárias de ratos indicam que a glicose não afeta significativamente o E_{GSH} no compartimento citosólico, ao menos que ele seja um pouco oxidado por baixas concentrações de H_2O_2 exógeno (78). Decidimos, portanto, verificar se uma baixa concentração de H_2O_2 (10 μ mol/l) pudesse desmascarar um possível efeito da deficiência de NOX2 sobre a fluorescência do sensor GRX1-roGFP2. A exposição aguda ao H_2O_2 extracelular aumentou rapidamente a oxidação da sonda, sem apresentar diferenças entre os grupos (Figura 11). Sob estas condições, a omissão e reintrodução de glicose significativamente aumentou e, em seguida, reduziu a taxa de fluorescência de GRX1-roGFP2. Entretanto, essas respostas foram similares nos dois tipos de ilhotas (Figura 11). Estes resultados sugerem que a NOX2 não participa na regulação aguda da glicose sobre o E_{GSH} citosólico em ilhotas de camundongos.

Figura 11 – Efeitos da glicose sobre a oxidação da sonda GRX1-roGFP2 após exposição a baixa concentração de H₂O₂. Ilhotas WT e NOX2-KO, expressando fluorescência de GRX1-roGFP2, foram perfundidas com Krebs contendo 10 μmol/l de H₂O₂ e 10, 0 ou 30 mmol/l de glicose (G10, G0 e G30, respectivamente) antes de adição final de 10 mmol/l DTT (0%), seguida por 100 μmol/l aldrithiol (AT-2) (100%), na presença de G10, para normalização dos dados. Os valores correspondem à média ± EPM de 3 experimentos. **, P<0,01 para efeito do H₂O₂ dentro de cada grupo; ***, P<0,001 efeito da glicose na presença de H₂O₂. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Apesar da aparente falta de impacto da ausência da NOX2 sobre o E_{GSH} citosólico, não descartamos a possibilidade da NOX2 produzir efeitos apenas em regiões específicas da célula β, como, por exemplo, sob micro-domínios na membrana plasmática (93), ou, como previamente sugerido, em proximidade à proteínas da maquinaria exocitótica (18). Uma outra possibilidade é que as alterações redox na célula β, induzidas pela NOX2, estejam fora do limite de detecção do sensor GRX1-roGFP2 (63). Sobre isso, o fato de que os biosensores roGFP estão quase totalmente reduzidos no compartimento citoplasmático, pode dificultar a mensuração de pequenas mudanças redox induzidas pela NOX2.

Futuramente, essas e outras limitações poderão ser contornadas com desenvolvimento de biosensores redox mais sensíveis à ambientes reduzidos, ou ainda, específicos para radicais livres. Nosso grupo, em parceria com o Dr. Jean-Christophe Jonas na Bélgica, tentou gerar um adenovírus a partir do plasmídeo p47-roGFP2, um sensor roGFP2 acoplado a proteína p47^{phox}, que foi gentilmente cedido pelo Dr. George G. Rodney (EUA). Infelizmente não foi possível a criação do adenovírus a partir do plasmídeo obtido. Caso conseguíssemos, utilizaríamos em nosso trabalho como ferramenta para visualizar a oxidação

de tióis, próximos a micro domínios da proteína reguladora p47^{phox} (63). E não a atividade da NOX, como proposto inicialmente (23).

Como dito acima, uma outra alternativa seria o uso de sondas redox específicas para radicais livres. Neste contexto, recentemente um estudou apresentou uma nova sonda redox para o radical superóxido gerado no compartimento mitocondrial (94). Contudo, a especificidade deste novo sensor não foi totalmente aceita por outros pesquisadores da área redox (95).

Com a aquisição do plasmídeo contendo o sensor p47-roGFP2, mencionado anteriormente, decidimos testar a oxidação de tióis próximo à proteína p47^{phox} em células β -pancreáticas. Para isso, transfectamos os plasmídeos cedidos pelo Prof. Rodney em células INS-1E (de ratos) e MIN6 (de camundongos), secretoras de insulina, e avaliamos a fluorescência do sensor p47-roGFP2 por microscopia confocal. Diferentemente de adenovírus, a intensidade do sinal (fluorescência) foi muito baixa em ambas as linhagens celulares. Com isso, testamos apenas a possível ativação da NOX e a migração da p47^{phox} com PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*), um ativador clássico da NADPH oxidase (96), ou com alta glicose, nestas células.

Em nossas imagens, aparentemente 24 horas de cultura na presença de 100 nmol/l de PMA não alterou a localização subcelular da sonda p47-roGFP2 em células MIN6 ou INS-1E. Ainda, neste último tipo celular, não foram constatadas diferenças visuais entre cultura prolongada em G10 vs. G30 (Ver figuras 21 e 22 em apêndice). Vimos também em um teste que o PMA falhou em aumentar a oxidação de tióis de ilhotas de camundongos (Ver figura 23 em apêndice). Ressaltamos, contudo, que, embora estudos prévios tenham mostrado a ineficácia do PMA em ativar a NOX e, conseqüentemente, gerar o radical O₂⁻ em células β (INS832/12) (62), nossas imagens e experimentos foram apenas testes e os resultados são inconclusivos.

Além de sondas redox geneticamente codificadas, sensores fluorescentes químicos são frequentemente utilizados como marcadores indiretos de ERO. Estudos anteriores em nosso laboratório, utilizando a oxidação do composto DHE em ilhotas de ratos *ex vivo*, observaram modulação do “conteúdo de superóxido” e atividade da NOX pela glicose (33, 39). Nesses estudos, após o isolamento, as ilhotas foram incubadas em condições glicêmicas próximas aos níveis circulantes *in vivo*. Decidimos, portanto, testar os efeitos da exposição de

1 hora em baixa e alta glicose, respeitando os limites fisiológicos, sobre a oxidação do composto químico DHE em ilhotas WT e NOX2-KO recém isoladas.

Como pode ser observado na figura 12A, ilhotas WT apresentaram maior fluorescência do DHE em 2,8 mmol/l vs. 16,7 mmol/l de glicose. As ilhotas NOX2-KO, por sua vez, apresentaram menor oxidação de DHE em 2,8 mmol/l do que WT (Ver figura 24 em apêndice). Com a baixa oxidação da sonda DHE nesta condição, não foi observada diferença entre G2,8 vs. G16,7 nas ilhotas nocautes. Estes resultados sugerem que a oxidação de DHE em baixa glicose, mas não em alta, pode ser decorrente do $O_2^{\cdot-}$ gerado pela NOX2 em ilhotas *ex vivo*. Uma condição em que a enzima Sod1 (ou cobre/zinco Cu/Zn-SOD), citosólica, estaria menos ativa (97).

A modulação da atividade da Sod1 pela glicose (97) também, poderia mascarar uma maior oxidação do DHE via NOX, em 16,7 mmol/l de glicose. Nesta última condição, onde os níveis intracelulares de NADPH, substrato para NOX e, conseqüentemente, formação de $O_2^{\cdot-}$, estão aumentados, há também aumento na ativação da Sod1 e eliminação de grande parte do radical livre, mascarando os resultados do composto DHE, em que os produtos da sua oxidação (exemplo: ânion superóxido) não foram identificados por HPLC (70).

Com a diferença na oxidação do DHE em baixa glicose, decidimos avaliar os efeitos da glicose e da ausência da NOX2, sobre a secreção e conteúdo de insulina, utilizando o mesmo modelo experimental anterior – ilhotas *ex vivo*. Como esperado, a secreção de insulina foi maior em 16,7 mmol/l do que 2,8 mmol/l de glicose. Contudo, a resposta secretória ao açúcar e também, o conteúdo de insulina, foram similares entre as ilhotas WT e NOX2-KO (Figura 12B). Com isso, os resultados obtidos *ex vivo* sugerem que, embora ilhotas nocautes para NOX2 apresentem menor oxidação do DHE em 2,8 mmol/l de glicose, a ausência da enzima não afeta a resposta secretória da célula β nesta condição. Adicionalmente, a NOX2 não contribui para o controle redox da secreção em 16,7 mmol/l de glicose.

Figura 12 – Efeitos da glicose sobre a oxidação de DHE e secreção de insulina em ilhotas WT e NOX2-KO *ex vivo*.

Após o isolamento, ilhotas foram pré-incubadas em solução Krebs contendo 2,8 mmol/l de glicose por 30 min a 37 °C. Em seguida, foram transferidas e incubadas por 60 min em baixa e alta glicose (concentrações descritas nos gráficos). A, fluorescência do composto DHE normalizada por área de ilhota; B, secreção e conteúdo de insulina normalizados por tempo e ilhota. Os valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. *, $P < 0,01$ para efeito da glicose dentro de cada grupo; #, $P < 0,001$ para diferenças entre ilhotas WT e NOX2 KO.

Em outras palavras, a modulação redox da exocitose pode ocorrer somente a partir de 20 mmol/l do nutriente. Em um estudo recente foi demonstrado a participação da NOX2 sobre a geração de $O_2^{\cdot-}$ (oxidação de DHE e identificação dos compostos químicos por HPLC) na presença de 22,8 mmol/l de glicose, em lisados de ilhotas de camundongos (18). A partir desta concentração, com a aceleração do metabolismo e o aumento intracelular do NADPH, haveria maior transferência de elétrons do substrato para o O_2 , formando, consequentemente, $NADP^+$ e $O_2^{\cdot-}$, mesmo com a atividade da Sod1 aumentada.

Outra possibilidade sobre o papel da NOX2 na exocitose de células β , seria a de que os produtos gerados pela NOX2 induzam mudanças do pH de grânulos secretores ou em regiões próximas a eles (98). Em células dendríticas, a ativação da NOX2 e a geração sustentada de baixos níveis de oxidantes, participam do controle do pH no lúmen do fagossomo e, posteriormente, no processo de proteólise (25). Contudo, esse fenômeno entre NOX2 e controle do pH local, ainda não foi descrito no pâncreas endócrino, sendo apenas uma hipótese a ser investigada.

Os resultados obtidos *in vitro* e *ex vivo*, somados, sugerem que a modulação da resposta secretória de ilhotas de camundongos pela NOX2, pode ocorrer a partir de 20 mmol/l

de glicose. Adicionalmente, indicam também que a modulação na secreção em alta glicose não está relacionada com alterações no metabolismo celular (NAD(P)H e $[\text{Ca}^{2+}]_i$), oxidação de GSH citosólica, ou pela geração de O_2^- em 16,7 mmol/l. Isto é, a ausência da NOX2, com exceção da exocitose, não altera a responsividade de ilhotas à glicose. Diante da falta de impacto da deficiência da NOX2 sobre o metabolismo e modulação redox no citosol, nos perguntamos quais seriam os efeitos crônicos da glicose e da ausência de NOX2, sobre a oxidação de tióis no citosol, função e sobrevivência de células- β primárias de camundongos.

Primeiramente, decidimos medir a oxidação de tióis após cultura prolongada em diferentes concentrações de glicose, inclusive em baixa, onde constatamos efeito positivo na ausência de NOX2 sobre a oxidação do DHE. Para tal, utilizando a sonda roGFP1 (não fundida com GRX1), que reage lentamente com a glicose, medimos as mudanças crônicas do balanço redox de tióis, após cultura prolongada contendo 2, 10 ou 30 mmol/l de glicose (G2, G10 ou G30, respectivamente) em ilhotas WT e NOX2-KO.

Como pode ser melhor visto na figura 13D, 18 horas de cultura em G30 aumentou significativamente a oxidação da sonda roGFP1, em relação as outras condições testadas (G2 e G10). O que reflete um aumento da oxidação de tióis (por exemplo, glutathiona) no compartimento citosólico. Os resultados de oxidação de roGFP1 em G2 *versus* G10, corroboram, pelo menos, em parte, com um estudo prévio em células β de ratos. Nele, os autores mostram que cultura prolongada em baixa glicose, não induz oxidação de roGFP1, mas, sim, o desequilíbrio redox mitocondrial e, posteriormente, a disfunção e morte destas células (77). Em relação aos grupos, por sua vez, nossos resultados mostram que a oxidação da sonda não foi diferente entre ilhotas WT e NOX2-KO, sugerindo que a deficiência de NOX2, não protege da oxidação de tióis induzida por alta glicose.

Figura 13 – A deficiência de NOX2 não tem repercussão sobre a fluorescência de roGFP1 em ilhotas de camundongos cultivadas em diferentes concentrações de glicose. Ilhotas WT e NOX2 KO expressando fluorescência de roGFP foram mantidas 18 horas em meio de cultura contendo 2 mmol/l (A), 10 mmol/l (B) ou 30 mmol/l de glicose (C). Após cultura, ilhotas WT e NOX2 KO foram perfundidas, com Krebs na mesma concentração de glicose em que foram cultivadas, por 20 min, até aplicação final de 10 mmol/l DTT (0%) e depois 100 μ mol/l *aldrithiol* (AT-2) (100%), na presença de G10, para normalização dos dados. Os valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3-4 experimentos. ***, $P < 0,001$ efeito da glicose dentro de cada grupo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Uma vez que reduções no conteúdo de GSH ou até mesmo de Grxs podem alterar a funcionalidade do biossensor roGFP (63), decidimos testar se aumento na oxidação em G30 era ocasionado por alterações na concentração de H_2O_2 em ilhotas. Para isso, repetimos o protocolo anterior (18h de cultura em G10 ou G30) com ilhotas expressando uma sonda roGFP2 acoplada com a molécula Orp1 (roGFP2-Orp1) e altamente sensível ao H_2O_2 (28). Sabemos ainda que em células- β de rato, a resposta deste sensor à glicose é similar à roGFP1 - mais lenta do que GRX1-roGFP2. Contudo, ela é bem mais sensível a baixas concentrações de H_2O_2 exógenos (Jonas et al. dados não publicados).

Nossos dados de cultura prolongada em G30 apresentaram aumento na oxidação do sensor roGFP2-Orp1 em comparação a G10 (Figura 14), confirmando os resultados obtidos com roGFP1. Em relação aos grupos, ilhotas WT e NOX2-KO não apresentaram diferenças nas duas condições testadas (Figura 14). Portanto, somados, nossos resultados sugerem que períodos longos em alta glicose aumenta a oxidação de tióis citosólicos. Um efeito que não depende da enzima NOX2, mas, sim, da concentração de H_2O_2 .

Figura 14 – A ausência de NOX2 não altera a fluorescência de roGFP2-Orp1 em ilhotas cultivadas em alta glicose. Ilhotas WT e NOX2 KO expressando fluorescência de roGFP foram mantidas 18 horas em meio de cultura contendo 10 mmol/l (G10) ou 30 mmol/l de glicose (G30). Após cultura, ilhotas WT e NOX2 KO foram perfundidas com Krebs, na mesma concentração de glicose em que foram cultivadas, por 20 min, até aplicação final de 10 mmol/l DTT (0%) e depois 100 μ mol/l aldrithiol (AT-2) (100%), na presença de G10, para normalização dos dados. Os valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3-4 experimentos. ***, $P < 0,001$ efeito da glicose dentro de cada grupo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Dentre as possíveis causas do aumento de H_2O_2 , consideramos as seguintes possibilidades: i) de que longos períodos em alta glicose mude a defesa antioxidante; ii) ou ative outros sistemas pró-oxidantes. Sobre a primeira, uma possível redução do sistema antioxidante ocasionaria aumento de H_2O_2 e, conseqüentemente, na oxidação dos sensores roGFP. Dentre os antioxidantes, consideramos pouco provável que seja por alterações no conteúdo de glutathiona. Isso porque, a oxidação de roGFP1, direcionada ou não para a mitocôndria ((mito-)roGFP1), não está relacionada ao conteúdo de glutathiona total em células β de ratos (77, 99). Sobre a segunda suposição, ativação de outros sítios de geração de oxidantes, poderia estar relacionado à ação ou compensação de outras NOX. Contudo, em um estudo prévio não foi observado efeito compensatório em ilhotas de camundongos nocautes para diversas NADPH oxidases (NOX1, NOX2 E NOX4) (18).

Diversos estudos demonstram que o estresse oxidativo pode contribuir para a disfunção das células β e a apoptose de ilhotas pancreáticas. Como já dito, disfunções redox podem ocorrer durante a cultura prolongada de ilhotas em baixa (77) ou alta vs. intermediárias concentrações de glicose (79). Nós, portanto, decidimos testar o papel da NADPH oxidase 2 sobre a responsividade de ilhotas à glicose, após períodos maiores de cultura. Para isso, reavaliamos a resposta de NAD(P)H e o $[Ca^{2+}]_i$, induzidas pela glicose, em ilhotas NOX2-KO e WT após cultivo prolongado em G2, G10 ou G30.

As figuras 15B e 16B, mostram, respectivamente, que as respostas de NAD(P)H e $[Ca^{2+}]_i$ após uma semana de cultura em G10, foram semelhantes às nossas medidas anteriores após alguns dias de cultura (Figuras 8 e 9). Contudo, após uma semana de cultura em G2 ou G30 a responsividade à glicose foi alterada, tendo a cultura G2 apresentado fortes mudanças na responsividade de NAD(P)H (Figuras 15A) e $[Ca^{2+}]_i$ (Figuras 16A) à glicose. Em G30, por outro lado, houve uma sensibilização das ilhotas à glicose, antecipando a resposta metabólica com concentrações menores do nutriente (Figuras 15C e 16C). Esses resultados confirmam que intermediárias concentrações de glicose, são ideais para o ótimo funcionamento do metabolismo de ilhotas pancreáticas *in vitro* (50, 100). Em relação aos grupos, contudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre ilhotas WT e NOX2-KO sob as condições mencionadas acima. Assim, esses resultados sugerem que NOX2 não tem participação sobre as alterações metabólicas induzidas após uma semana de cultura em baixa ou alta vs. intermediárias concentrações de glicose.

Figura 15 – Ausência de NOX2 não afeta a responsividade de NAD(P)H à glicose alterada após uma semana de cultura em diferentes concentrações de glicose. Após uma semana em cultura na presença de 2 mmol/l (A), 10 mmol/l (B) ou 30 mmol/l (C) ilhotas WT e NOX2 KO foram gradualmente estimuladas por crescentes concentrações de glicose (Gn em mmol/l, como especificado em cada gráfico) antes da adição final de 10 μ mol/l de FCCP. Os valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Figura 16 – A deficiência de NOX2 não afeta a responsividade do cálcio à glicose alterada após uma semana de cultura em diferentes concentrações de glicose. Após 1 semana em cultura na presença de 2 mmol/l (A), 10 mmol/l (B) ou 30 mmol/l de glicose (C) ilhotas WT e NOX2 KO foram gradualmente estimuladas por crescentes concentrações de glicose (Gn em mmol/l, como especificado em cada gráfico) em Krebs contendo 4,8 mmol/l de K^+ antes da total despolarização com 30 mmol/l de K^+ na presença de 250 μ mol/l de diazóxido (K30Dz). Valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Vimos anteriormente que a ausência de NOX2 melhora a secreção de insulina pela glicose por um mecanismo independente do metabolismo celular ou da oxidação de GSH. Vimos também, que o cultivo em G30 aumenta a concentração citoplasmática de H_2O_2 por uma via que não depende da NOX2, e que este aumento de H_2O_2 contribui para a oxidação de tióis no compartimento citosólico. Dentro deste contexto, sabe-se que a exposição prolongada a altos níveis de glicose pode causar disfunção e morte de células- β pancreáticas, contribuindo para a diminuição gradual da massa de célula β funcional em pacientes do T2D. Decidimos então, testar a possível participação da NOX2 sobre a funcionalidade e sobrevivência de células β de camundongos após cultura prolongada em G30, ou seja, em um ambiente de glicotoxicidade.

Primeiramente, observamos que a secreção corrigida por DNA e o conteúdo de insulina foram aproximadamente 50% menores após uma semana de cultivo na condição controle G10 (Figura 17A), quando comparadas com nossos experimentos iniciais (Figura 7A e D). Assim mesmo, ilhotas NOX2-KO apresentaram, em uma menor magnitude, aumento na secreção em 30 mmol/l de glicose, com valores similares de conteúdo remanescente de insulina, em comparação ao grupo WT (Figura 17A).

Quanto ao cultivo de ilhotas em G30, houve uma melhora na resposta à glicose em 15 mmol/l, mas, não em 30 mmol/l de glicose, em comparação às ilhotas cultivadas em G10 (Figura 17). O aumento da secreção é um efeito conhecido em ilhotas de camundongos após uma semana de cultura em alta glicose. Sabe-se que ilhotas desse tipo de roedor apresentam uma melhor adaptação ao cultivo prolongado com alta glicose, em comparação às de ratos (100). No entanto, essas diferenças ainda não são totalmente compreendidas (101).

Quanto aos grupos, diferentemente da cultura em G10, tanto a resposta secretória, quanto o conteúdo de insulina, foram praticamente idênticos após uma semana em G30. A melhora secretória na ausência de NOX2 foi primeiramente atribuída pela interação entre o $O_2^{\cdot -}$ na via intracelular AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e a enzima PKA (*protein kinase A*) (18). Mas, o fato de que cultura prolongada em alta glicose reduz o conteúdo de AMPc e a expressão e atividade da PKA (102), poderia compensar os efeitos positivos do nocaute para NOX2 sobre a exocitose de insulina. Contudo, nossos dados não permitem confirmar essa suposição. Eles revelam até o momento que pode não haver participação da NOX2 sobre

concentração citosólica de H_2O_2 , oxidação de tióis, metabolismo e no processo secretório após cultura em alta glicose.

Figura 17 – A deficiência de NOX2 não tem efeito sobre as alterações de secreção estática de insulina induzidas após uma semana de cultura em alta glicose. Após uma semana de cultura, ilhotas foram incubadas 60 min em Krebs contendo diversas concentrações de glicose. (A) secreção normalizada por DNA em ilhotas cultivadas na presença de 10 mmol/l (G10) ou (B) 30 mmol/l de glicose (G30). Taxa de conteúdo de insulina por DNA de ilhota. Valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. *, $P < 0,05$ efeitos da glicose dentro de cada grupo; #, $P < 0,05$; para diferenças entre ilhotas WT e NOX2 KO.

Como mencionado anteriormente, é sabido que existem diferenças entre ilhotas pancreáticas de ratos e camundongos. Ilhotas de rato cultivadas por uma semana em G30 apresentam desregulação do estado redox mitocondrial, disfunção e apoptose de células β (79). Enquanto que, de camundongo, glicotoxicidade e morte celular são visualizadas somente após 3 semanas de cultura na mesma concentração do nutriente (86). Em virtude disso, decidimos reavaliar as respostas metabólicas e funcionais de células β em ilhotas WT e NOX2-KO, após 21 dias de cultura em G10 ou G30.

Conforme mostrado na figura 18A e C, o aumento de NAD(P)H e do influxo de Ca^{2+} , induzidos pela glicose, foram semelhantes aos nossos resultados anteriores de cultura G10 – aumento do metabolismo, sem diferenças entre ilhotas WT e nocautes para NOX2. Em relação a secreção e o conteúdo de insulina, contudo, as respostas foram similares entre os grupos

(Figura 18E). O conteúdo de insulina não apresentou uma maior redução em comparação a uma semana de cultura em G10 e nem diferenças entre os grupos (Figura 18E). Para surpresa, o fato das ilhotas NOX2-KO apresentarem mesma resposta secretória em 30 mmol/l de glicose após 21 dias de cultura G10, indica que pode haver adaptações e/ou mecanismos envolvidos ainda não descritos *in vitro*, como, por exemplo, interação com componentes endoteliais.

Em relação aos efeitos da glicotoxicidade após 3 semanas de cultivo, tanto o aumento de NAD(P)H, quanto o influxo de Ca^{2+} , nota-se que em virtude dos valores basais elevados, a resposta a glicose é quase que inexistente após estímulo com 6-10 mmol/l de glicose, (Figura 18B e D). Tais alterações, contudo, não refletiram em uma menor resposta secretória ou conteúdo de insulina (Figura 18F). A secreção de insulina ocorreu tanto após o estímulo de 15 mmol/l, quanto em 30 mmol/l de glicose. A ausência de NOX2, por sua vez, não refletiu em nenhuma alteração nas condições e parâmetros testados, questionando o papel da NOX2 nas células β em ambientes hiperglicêmicos (40, 103).

Estudos prévios com ilhotas de ratos apresentam uma redução tempo-dependente na quantidade de insulina liberada no meio de cultura, tanto durante G10, quanto G30 (104). Sendo que, em alta glicose, a perda de função ocorre de forma mais intensa. Tal declínio funcional é devido aos efeitos tóxicos de longos períodos com alta glicose. Ao que sabemos, tais efeitos ainda não foram documentados em ilhotas de camundongos C57BL/6J.

Diante do exposto anteriormente, avaliamos a quantidade de insulina secretada no meio de cultura ao longo das 3 semanas de cultivo. Como esperado, a quantidade de insulina foi bem maior na condição G30 em comparação a G10 (Figura 19). Contudo, em nossos experimentos não ocorreu queda de função da célula β durante a cultura em G30, mas, sim, apenas um moderado declínio em G10. Adicionalmente, não houve diferença entre os grupos – apenas uma tendência das ilhotas NOX2-KO em secretarem mais insulina do que WT em G10, que foi sendo gradativamente reduzida durante a cultura prolongada (Figura 19B)

Assim, notamos que em G10, as ilhotas NOX2-KO tendem a perder, durante a cultura, sua capacidade de melhora na exocitose de insulina e que, durante G30, ilhotas de camundongos C57BL/6J são mais resistentes a disfunção celular induzida pelo cultivo prolongado em alta glicose, do que as de ratos. Esses resultados sugerem que a ausência de NOX2 não altera a resposta secretória de ilhotas de camundongos mantidas em cultura prologada com alta glicose.

Figura 18 – Falta de impacto da deficiência de NOX2 sobre a resposta de ilhotas à glicose após cultura prolongada em glicose. Ilhotas de camundongos foram cultivadas por 3 semanas na presença de 10 ou 30 mmol/l de glicose (G10 e G30, como indicado). A-D, após cultura, ilhotas WT e NOX2 KO foram simultaneamente perfundidas com Krebs contendo 4,8 mmol/l K^+ e crescentes concentrações de glicose (Gn em mmol/l, como especificado em cada gráfico), antes da adição final de 10 μ mol/l de FCCP (A-B), ou despolarização com 30 mmol/l de K^+ na presença de 250 μ mol/l de diazóxido (K30Dz)(C-D). E-F, após cultura, ilhotas foram pré-incubadas em G0,5 e em seguida incubadas em grupos de 5 ilhotas por 60 min na presença de várias concentrações de glicose. Valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3-4 experimentos. *, $P < 0,05$ efeitos da glicose dentro de cada grupo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Figura 19 – Ausência de NOX2 não modifica a secreção de insulina durante cultura prolongada em alta glicose. Após 2 dias de cultura G10, as ilhotas foram cultivadas em meio RPMI contendo 10 mmol/l (A) ou 30 mmol/l de glicose (B) (G10 e G30, como indicado). O meio foi renovado a cada 2-3 dias e salvo para mensuração de insulina secretada. Valores correspondem à média $\pm$ EPM de 3 experimentos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Nosso próximo passo foi investigar a apoptose de ilhotas e células β , após cultura prolongada em alta *versus* intermediária concentração de glicose. Além, é claro, da possível participação da enzima NOX2 sobre a sobrevivência de ilhotas. Para isso, medimos a taxa de fragmentação de DNA células primárias e a apoptose de célula β , ambas, ao final de 21 dias de cultura G10 ou G30.

Conforme pode ser visto na figura 20, após 3 semanas de cultura em G10, conhecida como uma condição ótima *in vitro* para a sobrevivência de ilhotas e células β de roedores (50, 105), as células primárias apresentaram valores baixos de morte celular. Em G10, ilhotas WT e NOX2-KO apresentaram respectivamente, aproximadamente 1% e 0,5% apoptose de células β (Ver figura 25 em apêndice). Em comparação à G10, ilhotas controle e nocaute tiveram um aumento aproximado de 5x e 8x, respectivamente, na morte celular após cultura G30 (Figura 20). Em relação aos grupos, não foram encontradas diferenças entre ilhotas WT e NOX2-KO nas duas condições testadas. Portanto, nossos resultados sugerem que a ausência de NOX2 não melhora a sobrevivência de células β -pancreáticas de camundongos. Adicionalmente, a ausência da enzima não protege dos efeitos tóxicos da alta glicose *in vitro*.

Figura 20 – Deficiência de NOX2 não melhora a sobrevivência de células β após cultura prolongada em alta glicose. Ilhotas de camundongos foram cultivadas por 3 semanas na presença de 10 ou 30 mmol/l de glicose (G10 e G30, como indicado). (A) Fragmentação de DNA de células primárias. (B) porcentagem de células β apoptóticas. Valores correspondem à média ± EPM de 3 experimentos. ***, $P < 0,001$; *, $P < 0,05$ para efeito da glicose dentro de cada grupo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Diferentemente do estímulo positivo de níveis fisiológicos de glicose, a exposição sustentada ou repetitiva à alta glicose, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, tem um efeito deletério sobre a funcionalidade e sobrevivência de células-β pancreáticas (106). Entretanto, os mecanismos envolvidos na glicotoxicidade não são totalmente esclarecidos e, em alguns casos, até controversos (107-109). Em nosso caso, baseados em estudos prévios, avaliamos se deficiência genética da NOX2 em ilhotas pancreáticas, poderia exercer efeito protetor contra a glicotoxicidade *in vitro* em células β. Embora tenhamos visto que isso não ocorra, há de se lembrar que existem diferenças entre experimentos *in vivo* e *in vitro* (100). Dentre elas, a principal talvez seja em relação a concentração de glicose. A glicotoxicidade *in vivo* ocorre em concentrações plasmáticas (aproximadamente 10-15 mmol/l de glicose), que ainda são benéficas para função e sobrevivência da célula β *in vitro* (50). Na cultura, toxicidade celular ocorre em níveis supra fisiológicos (entre 20-30 mmol/l de glicose), que são pouco prováveis de ocorrerem em pacientes diabéticos tratados (104, 110).

A falta de proteção da ausência de NOX2 sobre a morte celular, pode também, estar relacionada com as diferenças entre modelos experimentais e animais. A ausência de diversos fatores, como: hormônios, outros nutrientes (aminoácidos, ácidos graxos) e fatores de crescimento; podem estar relacionados a diferenças entre a glicotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, bem como, na ativação da NOX2. De qualquer forma, isso não desqualifica totalmente os

estudos *in vitro* (100). Nosso trabalho mostra que a relação entre NOX2 e glicotoxicidade *per se*, aparenta não ser tão importante para a sobrevivência de células β .

Outra limitação do nosso estudo pode estar relacionada ao componente genético dos animais nocautes e seus respectivos controles. Camundongos C57BL/6J, que são amplamente usados em transgenia, expressam a forma inativa de uma transidrogenase mitocondrial (NNT – *nicotinamide nucleotide transhydrogenase*), envolvida na produção de NADPH (111). Há indícios de que a mutação na enzima NNT, ou a sua inativação, induz anormalidades em mitocôndrias de hepatócitos e que reduz a funcionalidade de células β , favorecendo o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e obesidade em camundongos (112-114).

Embora não haja dados sobre uma relação direta entre NNT e NOX, não há dúvidas que agentes redutores, como, o NADPH, são importantes para as células (homeostase redox, funcionamento, atividade da NOX). Neste sentido, não descartamos a possibilidade de tal genótipo interferir em nosso modelo experimental de glicotoxicidade. Por isso, acreditamos que novos estudos *in vivo*, utilizando outros modelos animais (por exemplo, camundongos C57BL/6N com a forma ativa da NNT), e avaliando as outras NADPH oxidases (NOX1 e NOX4), precisam ser conduzidos para o melhor entendimento do papel da enzima em células do pâncreas endócrino. Só então, saberemos qual a função da NADPH oxidase em células β e se ela é um alvo-terapêutico a ser investido em patologias como o diabetes.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho vimos que a glicose induz um efeito duplo sobre a oxidação de tióis/GSH em ilhotas pancreáticas de camundongos. Agudamente, altas concentrações do nutriente reduz o E_{GSH} , enquanto que, cronicamente, aumenta a concentração de H_2O_2 , desencadeando o aumento na oxidação de tióis no compartimento citosólico.

O cultivo prolongado de ilhotas de camundongos em alta glicose sensibiliza a resposta metabólica, aumentando a secreção de insulina. Embora não apresente disfunção de células β , o cultivo em alta glicose aumenta a taxa de apoptose celular em comparação a condição controle *in vitro*, confirmando os efeitos tóxicos da exposição crônica à altos níveis de glicose sobre a sobrevivência de células β .

Sobre a função da NADPH oxidase em células β e ilhotas pancreáticas, além de um menor conteúdo de superóxido em baixa glicose (oxidação da sonda DHE em 2,8 mmol/l), confirmamos que a deficiência genética da NOX2 melhora a secreção de insulina a partir de 20 mmol/l de glicose. Tal efeito, contudo, não é devido a mudanças na resposta metabólica (aumento de NAD(P)H e do influxo de cálcio) ou de alterações no E_{GSH} , induzidas pela glicose, indicando um fino controle da exocitose pela enzima NOX2.

Cronicamente, o efeito positivo da deficiência de NOX2 sobre a exocitose é gradualmente perdido durante a cultura. A ausência de NOX2, por sua vez, não altera a oxidação de tióis no compartimento citosólico e nem previne o aumento de H_2O_2 induzido pelo cultivo prolongado com alta glicose. Similarmente ao estado redox no citosol, a ausência de NOX2 não interfere na sobrevivência de células β , mesmo em um ambiente de glicotoxicidade. Portanto, ao contrário do que se esperava, concluímos que, pelo menos *in vitro*, a NOX2 não é um componente crítico para a sobrevivência de células β de camundongos.

REFERÊNCIAS¹

1. Jolles S. Paul Langerhans. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):243.
2. Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes*. 1994;43(5):703-11.
3. Schuit FC. Is GLUT2 required for glucose sensing? *Diabetologia*. 1997;40(1):104-11.
4. Spégel P, Sharoyko VV, Goehring I, Danielsson AP, Malmgren S, Nagorny CL, et al. Time-resolved metabolomics analysis of β -cells implicates the pentose phosphate pathway in the control of insulin release. *Biochem J*. 2013;450(3):595-605.
5. 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.
6. Imoto H, Sasaki N, Iwase M, Nakamura U, Oku M, Sonoki K, et al. Impaired insulin secretion by diphenyliodonium associated with perturbation of cytosolic Ca^{2+} dynamics in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2008;149(11):5391-400.
7. Torres N, Noriega L, Tovar AR. Nutrient modulation of insulin secretion. *Vitam Horm*. 2009;80:217-44.
8. 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.
9. Malaisse WJ. Insulin secretion: multifactorial regulation for a single process of release. The Minkowski award lecture delivered on September 7, 1972 before the European Association for the study of Diabetes at Madrid, Spain. *Diabetologia*. 1973;9(3):167-73.
10. Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(11):1323-67.
11. Augusto O. Radicais Livres - Bons, Maus e Naturais. São Paulo: Oficina de texto; 2006. 115 p.
12. I.B. Ae. Signaling Mechanisms of Oxygen and Nitrogen Free Radicals 2009.
13. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973;52(3):741-4.
14. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999;401(6748):79-82.
15. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*. 1999;274(52):37265-9.
16. 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.
17. Syed I, Kyathanahalli CN, Jayaram B, Govind S, Rhodes CJ, Kowluru RA, et al. Increased phagocyte-like NADPH oxidase and ROS generation in type 2 diabetic ZDF rat and human islets: role of Rac1-JNK1/2 signaling pathway in mitochondrial dysregulation in the diabetic islet. *Diabetes*. 2011;60(11):2843-52.

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>

18. Li N, Li B, Brun T, Deffert-Delbouille C, Mahiout Z, Daali Y, et al. NADPH oxidase NOX2 defines a new antagonistic role for reactive oxygen species and cAMP/PKA in the regulation of insulin secretion. *Diabetes*. 2012;61(11):2842-50.
19. Rebelato E, Mares-Guia TR, Graciano MF, Labriola L, Britto LR, Garay-Malpartida HM, et al. Expression of NADPH oxidase in human pancreatic islets. *Life Sci*. 2012;91(7-8):244-9.
20. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):411-21.
21. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
22. Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*. 2004;76(4):760-81.
23. Pal R, Basu Thakur P, Li S, Minard C, Rodney GG. Real-time imaging of NADPH oxidase activity in living cells using a novel fluorescent protein reporter. *PLoS One*. 2013;8(5):e63989.
24. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):181-9.
25. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2006;126(1):205-18.
26. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223.
27. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, et al. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet*. 1995;9(2):202-9.
28. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, et al. Cloning the gene for an inherited human disorder—chronic granulomatous disease—on the basis of its chromosomal location. *Nature*. 1986;322(6074):32-8.
29. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int*. 2011;79(9):944-56.
30. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(6):453-71.
31. Taylor-Fishwick DA. NOX, NOX Who is There? The Contribution of NADPH Oxidase One to Beta Cell Dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:40.
32. Uchizono Y, Takeya R, Iwase M, Sasaki N, Oku M, Imoto H, et al. Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci*. 2006;80(2):133-9.
33. 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.
34. Jaquet V, Scapozza L, Clark RA, Krause KH, Lambeth JD. Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(10):2535-52.
35. 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.

36. 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.
37. Xiang FL, Lu X, Strutt B, Hill DJ, Feng Q. NOX2 deficiency protects against streptozotocin-induced beta-cell destruction and development of diabetes in mice. *Diabetes*. 2010;59(10):2603-11.
38. Weaver JR, Holman TR, Imai Y, Jadhav A, Kenyon V, Maloney DJ, et al. Integration of pro-inflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;358(1):88-95.
39. 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.
40. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R, et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia*. 2009;52(12):2489-98.
41. Anvari E, Wikström P, Walum E, Welsh N. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. *Free Radic Res*. 2015;49(11):1308-18.
42. Weaver JR, Grzesik W, Taylor-Fishwick DA. Inhibition of NADPH oxidase-1 preserves beta cell function. *Diabetologia*. 2015;58(1):113-21.
43. Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J*. 1981;199(2):393-8.
44. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):463-6.
45. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997;46(11):1733-42.
46. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*. 2013;1(1):244-57.
47. Peskin AV, Winterbourn CC. Taurine chloramine is more selective than hypochlorous acid at targeting critical cysteines and inactivating creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(1):45-53.
48. Laclau M, Lu F, MacDonald MJ. Enzymes in pancreatic islets that use NADP(H) as a cofactor including evidence for a plasma membrane aldehyde reductase. *Mol Cell Biochem*. 2001;225(1-):151-60.
49. Godoy JR, Funke M, Ackermann W, Haunhorst P, Oesteritz S, Capani F, et al. Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(1):2-92.
50. Bensellam M, Van Lommel L, Overbergh L, Schuit FC, Jonas JC. Cluster analysis of rat pancreatic islet gene mRNA levels after culture in low-, intermediate- and high-glucose concentrations. *Diabetologia*. 2009;52(3):463-76.

51. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch*. 2010;460(4):703-18.
52. Hinke SA, Hellemans K, Schuit FC. Plasticity of the beta cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic beta cell for the next meal. *J Physiol*. 2004;558(Pt 2):369-80.
53. Fridlyand LE, Philipson LH. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells? *Diabetes*. 2004;53(8):1942-8.
54. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2007;56(7):1783-91.
55. Ježek P, Dlasková A, Plecítá-Hlavatá L. Redox homeostasis in pancreatic β cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:932838.
56. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000;49(11):1751-60.
57. Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest*. 2003;33(9):742-50.
58. 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.
59. 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.
60. Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky KS, Roe MW, Philipson LH. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9796-801.
61. Roma LP, Duprez J, Takahashi HK, Gilon P, Wiederkehr A, Jonas JC. Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentration and glutathione redox state in rat pancreatic β -cells using ratiometric fluorescent proteins: confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1. *Biochem J*. 2012;441(3):971-8.
62. Broniowska KA, Mathews CE, Corbett JA. Do β -cells generate peroxynitrite in response to cytokine treatment? *J Biol Chem*. 2013;288(51):36567-78.
63. Schwarzländer M, Dick TP, Meyer AJ, Morgan B. Dissecting Redox Biology using Fluorescent Protein Sensors. *Antioxid Redox Signal*. 2015.
64. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(1-2):146-59.
65. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227-31.
66. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-55.
67. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(41):15038-43.

68. Buxser SE, Sawada G, Raub TJ. Analytical and numerical techniques for evaluation of free radical damage in cultured cells using imaging cytometry and fluorescent indicators. *Methods Enzymol.* 1999;300:256-75.
69. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(7):995-1022.
70. Zielonka J, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat Protoc.* 2008;3(1):8-21.
71. Winther JR, Jakob U. Redox control: A black hole for oxidized glutathione. *Nat Chem Biol.* 2013;9(2):69-70.
72. Meyer AJ, Dick TP. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(5):621-50.
73. Fujikawa Y, Morgan B, Dick T. Fluorescent Imaging of Redox Species in Multicellular Organisms.
74. Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods.* 2008;5(6):553-9.
75. Gutscher M, Sobotta MC, Wabnitz GH, Ballikaya S, Meyer AJ, Samstag Y, et al. Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases. *J Biol Chem.* 2009;284(46):31532-40.
76. Fujikawa Y, Morgan B, Dick T. Fluorescent Imaging of Redox Species in Multicellular Organisms. 2013. In: *Oxidative Stress and Redox Regulation* [Internet]. Springer; [119-55].
77. Roma LP, Pascal SM, Duprez J, Jonas JC. Mitochondrial oxidative stress contributes differently to rat pancreatic islet cell apoptosis and insulin secretory defects after prolonged culture in a low non-stimulating glucose concentration. *Diabetologia.* 2012;55(8):2226-37.
78. Takahashi HK, Santos LR, Roma LP, Duprez J, Broca C, Wojtusciszyn A, et al. Acute nutrient regulation of the mitochondrial glutathione redox state in pancreatic β -cells. *Biochem J.* 2014;460(3):411-23.
79. Duprez J, Roma LP, Close AF, Jonas JC. Protective antioxidant and antiapoptotic effects of ZnCl₂ in rat pancreatic islets cultured in low and high glucose concentrations. *PloS one.* 2012;7(10):e46831.
80. Sheikh-Ali M, Chehade JM, Mooradian AD. The antioxidant paradox in diabetes mellitus. *Am J Ther.* 2011;18(3):266-78.
81. Lortz S, Gurgul-Convey E, Naujok O, Lenzen S. Overexpression of the antioxidant enzyme catalase does not interfere with the glucose responsiveness of insulin-secreting INS-1E cells and rat islets. *Diabetologia.* 2013;56(4):774-82.
82. Pazdro R, Burgess JR. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(4):276-86.
83. Khaldi MZ, Elouil H, Guiot Y, Henquin JC, Jonas JC. Antioxidants N-acetyl-L-cysteine and manganese(III)tetrakis (4-benzoic acid)porphyrin do not prevent beta-cell dysfunction in rat islets cultured in high glucose for 1 wk. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(1):E137-46.
84. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 1967;16(1):35-9.
85. Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1236-47.

86. Pascal SM, Veiga-da-Cunha M, Gilon P, Van Schaftingen E, Jonas JC. Effects of fructosamine-3-kinase deficiency on function and survival of mouse pancreatic islets after prolonged culture in high glucose or ribose concentrations. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(3):E586-96.
87. Maechler P. Mitochondrial function and insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;379(1-2):12-8.
88. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia.* 2009;52(5):739-51.
89. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 2007;56(7):1783-91.
90. Khaldi MZ, Guiot Y, Gilon P, Henquin JC, Jonas JC. Increased glucose sensitivity of both triggering and amplifying pathways of insulin secretion in rat islets cultured for 1 wk in high glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(2):E207-17.
91. Gilon P, Henquin JC. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca²⁺ concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem.* 1992;267(29):20713-20.
92. Reinbothe TM, Ivarsson R, Li DQ, Niazi O, Jing X, Zhang E, et al. Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion. *Mol Endocrinol.* 2009;23(6):893-900.
93. Shao D, Segal AW, Dekker LV. Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett.* 2003;550(1-3):101-6.
94. Shen EZ, Song CQ, Lin Y, Zhang WH, Su PF, Liu WY, et al. Mitoflash frequency in early adulthood predicts lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2014;508(7494):128-32.
95. Schwarzländer M, Wagner S, Ermakova YG, Belousov VV, Radi R, Beckman JS, et al. The 'mitoflash' probe cpYFP does not respond to superoxide. *Nature.* 2014;514(7523):E12-4.
96. Curnutte JT, Erickson RW, Ding J, Badwey JA. Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *J Biol Chem.* 1994;269(14):10813-9.
97. 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.
98. Stiernet P, Guiot Y, Gilon P, Henquin JC. Glucose acutely decreases pH of secretory granules in mouse pancreatic islets. Mechanisms and influence on insulin secretion. *J Biol Chem.* 2006;281(31):22142-51.
99. Roma LP, Duprez J, Jonas JC. Glucokinase activation is beneficial or toxic to cultured rat pancreatic islets depending on the prevailing glucose concentration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(7):E632-9.
100. Jonas JC, Bensellam M, Duprez J, Elouil H, Guiot Y, Pascal SM. Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11 Suppl 4:65-81.
101. Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;364(1-2):1-27.
102. Kong X, Yan D, Wu X, Guan Y, Ma X. Glucotoxicity inhibits cAMP-protein kinase A-potentiated glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *J Diabetes.* 2015;7(3):378-85.

103. Sidarala V, Veluthakal R, Syeda K, Vlaar C, Newsholme P, Kowluru A. Phagocyte-like NADPH oxidase (Nox2) promotes activation of p38MAPK in pancreatic β -cells under glucotoxic conditions: Evidence for a requisite role of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1). *Biochem Pharmacol*. 2015;95(4):301-10.
104. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patanè G, Laybutt R, et al. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem*. 1999;274(20):14112-21.
105. Pascal SM, Guiot Y, Pelengaris S, Khan M, Jonas JC. Effects of c-MYC activation on glucose stimulus-secretion coupling events in mouse pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(1):E92-102.
106. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*. 2001;50 Suppl 1:S154-9.
107. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802-12.
108. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S97-107.
109. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S119-24.
110. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
111. Fontaine DA, Davis DB. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*. 2016;65(1):25-33.
112. Ronchi JA, Figueira TR, Ravagnani FG, Oliveira HC, Vercesi AE, Castilho RF. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic Biol Med*. 2013;63:446-56.
113. Nicholson A, Reifsnyder PC, Malcolm RD, Lucas CA, MacGregor GR, Zhang W, et al. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(10):1902-5.
114. Fergusson G, Ethier M, Guévremont M, Chrétien C, Attané C, Joly E, et al. Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol Metab*. 2014;3(9):848-54.

APÊNDICE

Apêndice A – Experimentos testes e imagens ilustrativas

MIN6 expressing p47phox-roGFP

Figura 21 – Expressão da sonda p47-roGFP2 em células MIN6. Imagens representativas de três preparações diferentes, adquiridas com microscópio confocal e utilizando objetiva de 100x.

INS1E expressing p47phox-roGFP

Figura 22 – Expressão da sonda p47-roGFP2 em células INS-1E. Imagens representativas de três preparações diferentes, adquiridas com microscópio confocal e utilizando objetiva de 100x.

Figura 23 – Efeitos do tratamento crônico com PMA e da ausência de NOX2 sobre a oxidação de tióis em ilhotas de camundongos. Após cultura G10, ilhotas expressando roGFP1 foram cultivadas 24 horas em meio RPMI G10, na presença, ou não (DMSO), de 100 nmol/l de *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA). Após cultura, ilhotas WT e NOX2-KO foram simultaneamente perfundidas por 20 min com solução Krebs G10, até aplicação final de 10 mmol/l DTT (0%) e depois 100 μ mol/l *aldrithiol* (AT-2) (100%), para normalização dos dados. Os valores correspondem à média $\pm$ EPM de um experimento contendo 3 ilhotas em cada grupo.

Figura 24 – Imagens representativas dos efeitos da glicose sobre a oxidação de DHE em ilhotas WT e NOX2-KO *ex vivo*. Após o isolamento, ilhotas foram pré-incubadas em solução Krebs contendo 2,8 mmol/l de glicose por 30 min a 37 °C. Em seguida, foram incubadas por 60 min em baixa e alta glicose (concentrações descritas na imagem acima). A fluorescência do composto DHE foi normalizada por área de ilhota.

Figura 25 – Imagens representativas de apoptose em células β após cultura prolongada em alta glicose. Ilhotas de camundongos WT ou NOX2-KO foram cultivadas por 3 semanas na presença de 10 ou 30 mmol/l de glicose (G10 e G30, como indicado). Apoptose –TUNEL (em verde); Células β marcadas com insulina (vermelho); e DAPI (azul).

ANEXOS

Anexos A – Artigos em submissão

- 1) **de Souza AH**, Santos LRB, Roma LP, Carpinelli AR and Jonas JC. Lack of NADPH oxidase-2 does not improve pancreatic β -cell survival and function in male C57BL/6J mouse islets cultured for 3 weeks at high glucose. In preparation, 2016.