Daniel Simões de Jesus

**A DESREGULAÇÃO DOS GENES RELÓGIO MODIFICA O ESTADO
REDOX DAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS E MODULA A SECREÇÃO DE
INSULINA ESTIMULADA PELA GLICOSE VIA NADPH OXIDASE**

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

SIMÕES, D. J. **A desregulação dos genes relógio modifica o estado redox das células β pancreáticas e modula a secreção de insulina estimulada pela glicose via NADPH oxidase.** 2015. 92 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os genes relógio são responsáveis pelo ritmo circadiano de diversos sistemas biológicos, contribuindo direta ou indiretamente para a manutenção da homeostase do organismo. No pâncreas endócrino, esse grupo de genes exerce um controle de grande importância sobre o metabolismo e a secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS) nas células β , e sua desregulação induz o desenvolvimento de diabetes. A NADPH oxidase (NOX) é um complexo enzimático responsável pela produção de ânion superóxido através da redução do oxigênio molecular. Sua presença nas células β pancreáticas está relacionada à regulação da GSIS e do metabolismo celular através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da consequente modulação do estado redox intracelular. Assim, o objetivo do nosso estudo foi verificar se a desregulação dos genes relógio, através do *knockdown* do fator de transcrição Brain and Muscle ARNT-Like 1 (Bmal1), é capaz de modular o complexo NADPH oxidase, o estado redox intracelular e, consequentemente, o metabolismo e a GSIS em linhagem celular INS-1E e em ilhotas pancreáticas de camundongos *knockout* tecido-específico para o Bmal1 (β -Bmal1^{-/-}). Nossos resultados demonstraram que a redução da expressão do Bmal1 em células INS-1E ocasionou a desregulação de outros genes relógio modulados por ele. Estas alterações induziram um aumento no conteúdo de EROs intracelular em diferentes concentrações de glicose (2,8 mM e 16,7 mM) e tal efeito foi mediado pela NADPH oxidase. A alteração na atividade da NOX ocasionada pela desregulação dos genes relógio, por sua vez, gerou um desbalanço no estado redox intracelular, verificado pela redução da concentração de glutatona (GSH), além de um aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase; diminuição da atividade das enzimas aconitase e GAPDH; e redução da razão ATP/ADP. Como resultado dessas alterações, observamos por fim uma deficiência na principal função das células β pancreáticas: as secreções basal e estimulada pela glicose da insulina. Experimentos adicionais com camundongos *knockout* para Bmal1 especificamente em células β pancreáticas também demonstraram a importância da NOX na regulação da secreção de insulina. Do mesmo modo que nas células INS-1E, ilhotas isoladas destes animais apresentaram aumento do conteúdo intracelular de EROs e desregulação da GSIS, sendo estes efeitos acompanhados por aumento da expressão gênica de subunidades da NOX. Estes camundongos apresentaram ainda menor tolerância à glicose que os controles, sem alterações na sensibilidade à insulina, corroborando os demais resultados, onde demonstramos que as modificações ocasionadas pela deficiência de Bmal1 refletem em um prejuízo na capacidade secretória das células β pancreáticas. Concluímos, portanto, que os genes relógio possuem um papel essencial na funcionalidade das células β pancreáticas através da regulação da produção de EROs via enzima NADPH oxidase, o que se reflete no controle da secreção de insulina. Sendo a manutenção do estado redox essencial para o funcionamento adequado da ilhota pancreática, o controle da atividade da NOX pelos genes relógio consiste em um mecanismo adicional que pode estar relacionado ao desenvolvimento do diabetes.

Palavras-chave: Genes relógio. Secreção de insulina. EROs. NADPH oxidase.

ABSTRACT

SIMÕES, D. J. **Clock genes dysregulation modifies the redox state of pancreatic β cell and modulates glucose stimulated insulin secretion via NADPH oxidase.** 2015. 92 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Clock genes are responsible for circadian rhythm of many biological systems, either directly or indirectly contributing to the maintenance of organism homeostasis. In pancreatic β cells, these genes play a very important control on metabolism and glucose stimulated insulin secretion (GSIS), and its dysregulation induces the development of diabetes. NADPH oxidase (NOX) is an enzymatic complex responsible for production of superoxide anion by reducing molecular oxygen. In pancreatic β cells, it is related to the regulation of cellular metabolism and GSIS by producing reactive oxygen species (ROS) and modulating intracellular redox state. The aim of our study was to determine whether the dysregulation of clock genes, by knocking down the transcription factor Brain and Muscle ARNT-Like 1 (Bmal1), can modulate the NADPH oxidase complex, the intracellular redox state and, therefore, the glucose metabolism and GSIS in INS-1E cell lineage and in pancreatic islets of tissue specific Bmal1 knockout mice (β -Bmal1^{-/-}). Our results showed that the reduction of Bmal1 expression in INS1-E cells led to a dysregulation of other clock genes. These changes induced an increase in intracellular ROS content when cells were exposed to different glucose concentrations (2.8 mM and 16.7 mM) and this effect was mediated by NADPH oxidase. The change in NOX activity caused by dysregulation of clock genes, in turn, generated an unbalance of the intracellular redox state, verified by a reduced concentration of glutathione (GSH), in addition to an increased activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase; decreased activity of aconitase and GAPDH; and decreased ATP/ADP ratio. As a result of these changes, we also found a deficiency in the main function of pancreatic β cells: the basal and glucose stimulated insulin secretion. Additional experiments with Bmal1 knockout mice in pancreatic β cells also demonstrated the relevance of NOX in the regulation of insulin secretion. As observed in INS-1E cells, isolated islets of these animals showed an increase in intracellular ROS content and dysregulation of GSIS, being these effects accompanied by an increase of gene expression of NOX subunits. These mice also showed lower glucose tolerance when compared to controls, with no changes in insulin sensitivity, confirming our previous results, which demonstrate that the changes caused by Bmal1 deficiency reflected in a loss of the secretory capacity of pancreatic β cells. We therefore conclude that clock genes have an essential role in pancreatic β cells function by regulating the production of ROS through NADPH oxidase, which reflects in the control of insulin secretion. Since the maintenance of the redox state is essential for the proper functioning of pancreatic islet, control of NOX activity by clock genes is an additional mechanism that may be related to the development of diabetes.

Keywords: Clock genes. Insulin secretion. ROS. NADPH oxidase.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Genes Relógio

As diferentes formas de vida evoluíram adaptando-se ao ciclo claro/escuro gerado pela rotação da terra em seu próprio eixo(1). A maioria delas desenvolveu os genes do relógio, que controlam o ritmo circadiano e a homeostase dos sistemas biológicos, regulando processos fisiológicos e metabólicos(2). Os sistemas envolvidos no ritmo circadiano são altamente conservados e capazes de adaptar o organismo às mudanças que ocorrem diariamente, como ciclo claro/escuro e a alternância entre os estados alimentado e jejum. São responsáveis também pelo controle das funções fisiológicas, incluindo o ciclo sono/vigília, temperatura corpórea, secreção de hormônios, atividade locomotora e comportamento alimentar(1). Em humanos, a dessincronização dos ritmos circadianos tem um impacto em muitas funções fisiológicas e está diretamente relacionado à insônia, depressão, doenças cardiovasculares e câncer(3, 4).

O relógio central dos mamíferos está localizado em uma pequena região do hipotálamo que consiste em aproximadamente 15.000 neurônios, denominada núcleo supraquiasmático (NSQ)(5, 6). Com o avanço dos estudos nesta área, os genes relógios foram identificados em muitas outras regiões cerebrais, como no núcleo paraventricular, núcleo arqueado, glândula pineal e bulbo olfatório. O relógio central, ou *master clock*, recebe sinais do ambiente e realiza a integração com os relógios periféricos(1, 7), os quais estão localizados em diversos tecidos, como rins, fígado, coração, ilhotas pancreáticas e músculo(8-12).

Uma característica importante dos genes relógio é que eles possuem a capacidade de se auto-regular e, por isso, as oscilações circadianas que são intrínsecas de cada célula regulam sua própria ritmicidade sem a necessidade de estímulos externos. Entretanto, como as oscilações dos genes do relógio não consistem em um período exato de 24 horas, o relógio endógeno necessita ser sincronizado também pelo ambiente externo. Os estímulos capazes de sincronizar estas oscilações auto-sustentadas apresentadas pelos genes relógio são denominados agentes sincronizadores, ou *zeitgebers* (do alemão “doadores de tempo”). Os *zeitgebers* tem a capacidade de “reiniciar” o sistema e prevenir que o relógio endógeno perca sua sincronização. O principal sincronizador dos genes relógio é a luz(13).

Em mamíferos, células especializadas detectam os sinais de luz, que são transmitidos para o NSQ através do trato retino-hipotalâmico (14). Nos neurônios do NSQ, através do trato retino-hipotalâmico, a luz desencadeia uma cascata de sinalização que medeia a ativação de um programa transcricional que regula os genes controlados pelo relógio (*clock-controlled genes* – CCGs)(15). Tal regulação está associada a modificações específicas na região promotora dos CCGs promovidas por histonas, que levam ao remodelamento da cromatina e, consequentemente, ao aumento ou redução da transcrição gênica.

Os tecidos periféricos também possuem genes circadianos que se auto-regulam. No entanto, não possuem a capacidade de responder ao ciclo claro/escuro e aparentemente são controlados por outros estímulos fisiológicos. Para que a ritmicidade circadiana seja mantida, esses genes se auto-regulam por alças de retroalimentação positivas e negativas em um período de aproximadamente $24 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$. Os principais genes que compõem a maquinaria da ritmicidade circadiana são: Clock (*circadian locomotor output cycles kaput*), Bmal1 (*brain and muscle ARNT-like protein 1*), Per (*period 1, 2 e 3*), Cry (*cryptochrome 1 e 2*), Rev-erba (*reverse strand of the c-erba gene*). Os genes relógio regulam a expressão dos chamados genes controlados pelo relógio, como o Dbp (*D-box binding protein*) e além disso, genes como o RORα (*retinoic acid orphan-related receptor α*), que também estão envolvidos no processo de transcrição e tradução dos genes relógio, apesar de não fazerem parte da maquinaria central do relógio(16).

O ciclo de retroalimentação dos genes circadianos se inicia com a transcrição e tradução dos genes Clock e Bmal1, seguida pela heterodimerização das respectivas proteínas sintetizadas formando o complexo CLOCK/BMAL1. Este, por sua vez, irá se ligar a uma região E-box na região promotora dos demais genes relógio como, por exemplo, Per e Cry, iniciando o processo de transcrição e posteriormente a tradução (**Figura 1**).

Figura 1 – Ilustração da transcrição/tradução dos genes relógio reguladas pelo heterodímero *CLOCK/BMAL1*. Fonte: Chen, L. e Yang, G. (2015)(17).

Quando as proteínas PER/CRY se acumulam no citoplasma, formam um complexo negatizador que impede a heterodimerização de CLOCK/BMAL1, inibindo assim sua ação indutora da transcrição dos genes relógio. Por outro lado, as proteínas PER/CRY, quando fosforiladas por uma caseína quinase (CKIε), são rapidamente degradadas. Assim, esta quinase vai primariamente desestabilizar PER/CRY, promovendo sua ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal, o que resulta na não inibição da formação do heterodímero (16).

Outros genes relógio que são fundamentais neste processo de ritmicidade são as REV-ERBα e REV-ERBβ, importantes nas oscilações circadianas do Bmal1. A proteína REV-ERBα atua na alça de feedback negativo, impedindo que BMAL1 e CLOCK se heterodimerizem. Esta função do Rev-erbα é mediada pelo recrutamento do complexo NCoR/HDAC3, que se liga ao promotor do gene BMAL1. A REV-ERBβ também funciona como uma proteína repressora [16]. O sistema relógio pode funcionar sem as Rev-erbs, mas estas são as responsáveis pela sintonia fina da ritmicidade (14, 18).

Outras proteínas importantes na regulação dos ritmos circadianos são as DEC1 e 2. Elas são responsáveis por inibir a ativação transcricional promovida pelo complexo CLOCK/BMAL1. Adicionalmente, a expressão do gene *Dec1* é controlada pelo complexo CLOCK/BMAL1 por um feedback negativo, podendo, portanto, ser categorizada como um gene controlado pelo genes relógio(18). Ademais, proteínas secundárias que também complementam o feedback e aumentam a amplitude do ritmo, como as proteínas DBP (proteína ligante do elemento D albumina), PAR (ricas em prolina), HLF (fator leucocitário hepático) e TEF (fator tireotrófico embrionário) pertencentes à família das bZIP17, também são controlados pelo relógio(18).

De acordo com o exposto acima, vê-se que a regulação e manutenção dos ritmos circadianos não se dão de forma simples, envolvendo mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. Os genes relógio, por sua vez, são capazes de sincronizar o metabolismo de duas maneiras. 1 - Através do controle da transcrição de enzimas metabólicas. 2- Regulando fatores endócrinos que influenciam metabolicamente os tecidos de maneira dependente do ciclo claro/escuro. Dentre os principais fatores metabólicos regulados pelo relógio se encontram PPAR α (*Peroxisome proliferator-activated receptor α*), REVERB α , ROR α , SIRT1 (Sirtuína 1), AMPK (*AMP-activated protein kinase*), PGC-1 α (PPAR *co-activator 1 α*) e NAMPT (nicotinamida fosforibosiltransferase).

Os genes relógio, contudo, podem também ser regulados pelo metabolismo. Estudos mostram que ratos tratados com dieta hiperlipídica perdem a sincronia da atividade locomotora e apresentam alterações dos ciclo alimentar e claro/escuro, devido à redução da expressão dos genes relógio nos tecidos periféricos(15).

Os genes relógio, além de sincronizarem diversos mecanismos celulares, também estão envolvidos na regulação do balanço redox. Um dos primeiros estudos a relacionar o estado redox e genes relógio mostrou que os cofatores de adenina dinucleotídeo, NAD⁺/NADH e NADP⁺/NADPH, são capazes de regular a atividade transcricional do CLOCK e seu homólogo, NPAS2. Estas coenzimas, porém, são capazes de promover a ligação dos heterodímeros CLOCK/BMAL1 e NPAS2/BMAL1 somente no estado reduzido, enquanto a forma oxidada inibe esta ligação (19). Considerando que a produção de espécies reativas de oxigênio é compartimentalizada(20), pode-se implicar que reações pró-oxidantes no núcleo com a habilidade de alterar o estado redox de coenzimas (NAD⁺/NADH e NADP⁺/NADPH), pode influenciar no ritmo circadiano dos genes relógio. Recentemente, demonstrou-se que

oscilações do estado redox das coenzimas FAD e NADPH alteram a excitabilidade dos neurônios do NSQ, sendo este mecanismo dependente de regulação não transcricional do canal para potássio(21).

Acredita-se que as flutuações redox também possam ser um mecanismo de controle do ritmo circadiano, embora esta hipótese ainda esteja sendo analisada. Estudos em peixe-zebra mostram que mudanças no balanço redox intracelular mediadas pelo inibidor da NADPH oxidase, DPI, são capazes de controlar ativamente a expressão de genes dependente de luz(22). A luz, que é o sincronizador do ritmo circadiano nesse organismo, regula a expressão dos genes relógio *zCry* e *zPer1*, através da geração de peróxido de hidrogênio (22). Kondratov et al. (2006) também demonstraram a importância dos genes relógio na manutenção do estado redox ao perceberem que camundongos knockout para o *Bmal1* (*Bmal1*^{-/-}) apresentam aumento da produção de EROs e deficiência no sistema antioxidante(23). A alteração do estado redox acelera o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças associadas à idade nestes animais(23).

Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa têm tentado esclarecer o papel dos genes relógio na regulação do metabolismo das ilhotas pancreáticas. Recentemente, Marcheiva et al (2010) mostraram que camundongos knockout para os genes relógio *Clock* (*Clock*^{-/-}) e *Bmal1* (*Bmal1*^{-/-} e β -*Bmal1*^{-/-}) apresentam hiperglicemia e hipoinsulinemia (12). Nesse mesmo trabalho, verificaram ainda que a secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS) em ilhotas isoladas estava prejudicada, possivelmente por problemas de extrusão do grânulo insulínico(12, 24). Posteriormente, Sadacca et al (2011) também observaram que o funcionamento intrínseco dos genes relógio nas ilhotas pancreáticas é importante para a GSIS e homeostase da glicose(25). Mais recentemente, Lee et al (2011 e 2013) demonstraram que a ausência do gene *Bmal1* induz o aumento da expressão proteica de UCP2 (proteína desacopladora 2), redução do potencial de membrana mitocondrial, perda da ritmicidade do fator de transcrição *Nrf2* e aumento da produção de EROs, com consequente prejuízo na GSIS(26, 27). Dessa forma, podemos constatar que os genes relógio são importantes para o controle da função das células β pancreáticas e que a desregulação desse sistema prejudica o processo de secreção de insulina.

1.2 Mecanismo de Secreção de Insulina Mediado Pela Glicose

O pâncreas endócrino é constituído pelas ilhotas pancreáticas, as quais são compostas por quatro principais tipos de células: alfa (α), beta (β), delta (δ) e PP, responsáveis pela produção dos hormônios peptídicos glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático, respectivamente. As ilhotas são constituídas principalmente por células β secretoras de insulina (70 – 80%), um hormônio polipeptídico responsável pela regulação da homeostase da glicose em diversos tecidos, como muscular, adiposo e hepático.

As células β pancreáticas têm como principal secretagogo a glicose plasmática(28). Entretanto, outros nutrientes também regulam a secreção de insulina, como ácidos graxos e aminoácidos. A liberação de insulina pela célula β em resposta à glicose ocorre em duas fases. Na primeira, um pico de secreção é detectado dentro de poucos minutos após o estímulo pela glicose, sendo este pico seguido por um rápido declínio, enquanto que na segunda fase, a secreção se inicia alguns minutos após a primeira fase e aumenta gradualmente, com pico entre 30-40 minutos(29-31).

A elevação da concentração plasmática de glicose aumenta o aporte desse nutriente para o interior das células β pancreáticas. O influxo de glicose para o citosol é mediado pelo transportador de glicose do tipo 2 (GLUT-2)(32). O GLUT2 possui um elevado K_m (entre 15 e 20 mM) e, portanto, não é saturável em concentrações fisiológicas de glicose, permitindo o equilíbrio rápido entre suas concentrações externa e interna quando a mesma apresenta-se elevada no meio extracelular(33). No meio intracelular, a glicose inicialmente é fosforilada à glicose-6 fosfato pela atividade de duas enzimas: uma de baixa afinidade, a hexoquinase IV ou glicoquinase (K_m 6 – 11 mmol/L), e outra de alta afinidade, a hexoquinase I (K_m < 0,1 mmol/L), sendo a primeira fundamental para a regulação da glicólise(34). Nas células β pancreáticas, o fluxo glicolítico é direcionado principalmente para a síntese de piruvato. O piruvato adentra a mitocôndria e é descarboxilado, gerando acetil-CoA e resultando na produção de NADH e $FADH_2$ (35). Essas coenzimas são oxidadas na cadeia de transporte de elétrons, o que aumenta consideravelmente a produção de ATP. O aumento da concentração citoplasmática de ATP e, conseqüentemente, da razão ATP/ADP, aumenta a probabilidade de fechamento dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), impedindo o efluxo de K^+ e resultando na diminuição da negatividade do potencial elétrico da membrana plasmática. Esse evento promove a despolarização da membrana, abrindo canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem (CCSV), o que aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} e promove a

ativação da maquinaria secretória da célula β , culminando com a extrusão dos grânulos insulínicos(36).

Durante o metabolismo da glicose, o fluxo glicolítico também pode ser desviado para a via das pentoses fosfato ou via do fosfogluconato, que é uma das principais fontes de geração de NADPH nas células β pancreáticas((37)). Após a formação de glicose-6 fosfato pela ação das enzimas glicosequinase ou hexoquinase, a ação da enzima glicose-6 fosfato desidrogenase é responsável pelo primeiro passo para a entrada da glicose nessa via metabólica((38)). Na via das pentoses fosfato, a glicose-6-fosfato sofre duas reações redox que são essenciais para a formação de duas moléculas de NADPH e para a formação de ribose-6 fosfato. O aumento da concentração de NADPH é extremamente relevante para o funcionamento das células β pancreáticas devido à sua participação no mecanismo de secreção de insulina modulando a extrusão dos grânulos insulínicos(39).

A secreção de insulina estimulada pela glicose pode ser potencializada por mecanismos independentes dos K_{ATP} . A ativação da enzima adenilato ciclase, por exemplo, resulta no aumento intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMP_C), segundo mensageiro ativador da proteína quinase A (PKA), a qual também contribui para a exocitose dos grânulos de insulina. Além disso, a PKA modula os canais para Ca^{+2} sensíveis à voltagem e K_{ATP} , sendo um importante fator amplificador da secreção de insulina estimulada pela glicose(36). No entanto, ambas as vias são dependentes do aumento intracelular do Ca^{2+} (40). Os mecanismos de secreção de insulina dependente e independente de K_{ATP} são altamente coordenados para assegurar a máxima resposta das células β quando estimuladas pela glicose(31).

O metabolismo da glicose também ativa enzimas associadas à membrana plasmática, como as isoformas da fosfolipase C (PLC), a fosfolipase A2 (PLA2), a fosfolipase D e a adenilato ciclase(33). A ativação dessas enzimas é mediada pela ligação de hormônios a receptores de membrana e/ou pelas variações da concentração do $[Ca^{+2}]_i$, resultando na formação de segundos mensageiros intracelulares que modulam a exocitose dos grânulos insulínicos.

A ativação das isoformas da PLC resulta na hidrólise de fosfolípidios de membrana, resultando na formação de 1,4,5 inositol-trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 promove a abertura de canais de Ca^{+2} localizados na membrana do retículo endoplasmático, desencadeando o efluxo de Ca^{+2} do interior da organela para o citoplasma e aumentando a

concentração deste íon no citosol. O DAG permanece na membrana e, juntamente com o íon Ca^{+2} , ativa diversas isoformas da proteína quinase C (PKC)(41). A PKC promove a fosforilação e ativação das proteínas do citoesqueleto que participam da translocação dos grânulos de insulina para a membrana plasmática, favorecendo a exocitose de insulina(42).

Recentemente, tem-se postulado que o balanço redox consiste em um fator adicional na modulação da secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS) e que, principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROs), possuem um papel determinante na regulação desse processo(43-45). No entanto, ainda não está bem estabelecido como as EROs participam do mecanismo de secreção de insulina e suas oscilações moduladas pela glicose.

1.3 Espécies Reativas de Oxigênio, Sistema Antioxidante e Balanço Redox

Radical livre, por definição, é qualquer elemento químico capaz de existir de forma independente e que possui um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência(46). O oxigênio (O_2) é um radical livre que possui dois elétrons desemparelhados em sua camada mais externa, o que confere a essa molécula pouca reatividade, limitação de velocidade de reação e estabilidade. As EROs, como o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$), se formam quando a redução do O_2 é incompleta. O O_2 precisa de quatro elétrons para ser completamente reduzido a duas moléculas de água (H_2O) (**Figura 2A**), porém é capaz de receber somente um elétron por vez, o que aumenta a probabilidade de geração de EROs ao longo desse processo(47).

A redução do O_2 pela incorporação de um único elétron em sua camada de valência resulta na formação do $\text{O}_2^{\bullet-}$, que é um radical instável, incapaz de atravessar as membranas celulares, mas com característica redutora(46). Quando um segundo elétron é adicionado ao $\text{O}_2^{\bullet-}$ forma-se o H_2O_2 , uma molécula não-radical, lipossolúvel e com alta capacidade de difusão. O H_2O_2 pode ser gerado tanto pela reação espontânea do $\text{O}_2^{\bullet-}$, como enzimaticamente, pela ação da superóxido dismutase (SOD)(48). Apesar de as moléculas não-radicalares não possuírem elétrons desemparelhados, ainda assim apresentam alguma reatividade. A adição de um elétron ao H_2O_2 leva à formação do $\text{OH}^{\bullet}$. O $\text{OH}^{\bullet}$ é altamente reativo em comparação com as demais EROs descritas, por isso possui meia vida baixa, reagindo apenas com moléculas adjacentes ao sítio de produção. Uma das grandes fontes de $\text{OH}^{\bullet}$ são as reações de Fenton e Haber-Weiss. A reação de Haber Weiss ocorre por meio da

troca de elétrons entre o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 gerando o $OH^{\bullet}$ (Figura 2B). A reação de Fenton consiste na redução do H_2O_2 pela presença endógena de Fe^{2+} e Cu^{2+} (Figura. 2C).

Figura 2 – Ilustração das diferentes vias de geração de espécies reativas de oxigênio. (A) Etapas da redução do oxigênio molecular até a formação de H_2O . **(B)** Geração de radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) a partir da reação de Haber Weiss. **(C)** Formação de $HO^{\bullet}$ a partir da reação de Fenton.

Fonte: Bachi et al. (2012)(47).

O organismo possui diversas fontes de produção de EROs, sendo as principais: 1- Cadeia de transporte de elétrons durante a fosforilação oxidativa(49); 2- Produção de H_2O_2 pela monoamina oxidase (MAO) durante a desaminação de aminas biogênicas na membrana mitocondrial(49); e 3- Reações enzimáticas através do metabolismo do O_2 , como as mediadas pela NADPH oxidase (NOX)(50), xantina oxidase (XO)(51), mieloperoxidase (MPO), citocromo p450, lipoxigenases e óxido nítrico sintases (NOS)(52).

Dentre esses, a cadeia de transporte de elétrons se destaca como o maior sistema produtor de EROs. Durante a fosforilação oxidativa, o $O_2^{\bullet-}$ pode ser produzido pelo complexo I (NADH desidrogenase) e pelo complexo III (ubiquinona oxoredutase)(49, 53). A quantidade de elétrons que vaza da cadeia de transporte de elétrons para reduzir o O_2 e gerar $O_2^{\bullet-}$ *in vivo* é difícil de ser estimada. Entretanto, valores entre 0.15-2% são propostos para mitocôndria de mamíferos, o que consiste em uma quantia significativa e capaz de lesar estruturas biológicas por oxidação de proteínas ou peroxidação lipídica.

Os possíveis danos oxidativos induzidos pelas EROs podem, em geral, ser controlados por um sistema de defesa antioxidante. O sistema antioxidante pode ser dividido em enzimático e não-enzimático(54). O sistema enzimático é composto pelas enzimas SOD, catalase, glutaredoxina (Grx), tireoredoxina (Trx) e pelo sistema da glutathiona (GSH), compreendido pela glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e NADPH(48, 55-57).

A SOD apresenta diversos subtipos, tendo como co-fatores cobre, zinco, ferro, manganês ou níquel(48). Ela catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O$)(58). A CuZnSOD está presente no citossol de eucariotos e em muitas bactérias. A MnSOD tem como característica ser insensível a cianeto e a H_2O_2 (59). A FeSOD é encontrada no citossol de bactérias e em cloroplastos de vegetais. Já a NiSOD é encontrada somente em procariontes(60).

A catalase, em suas diversas formas, possui o grupo prostético heme, que é geralmente acompanhado de uma molécula de NADPH(61). A catalase possui um elevado K_m , sendo dificilmente saturada, e atua em duas moléculas de H_2O_2 reduzindo-os a H_2O e O_2 e está presente na maioria dos animais, plantas, bactérias e fungos.

O sistema glutathiona é composto pela GSH, GPx, GR e NADPH. A GSH é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina e está amplamente presente em animais, plantas, fungos e bactérias(62). A GSH está presente em concentrações milimolares (1-10 mM) no citoplasma e é sintetizada a partir de seus aminoácidos constituintes pela ação sequencial da enzima dimérica γ -glutamato-cisteína ligase (GCL) e da GSH sintetase(63).

A GPx possui diversas variantes, contendo selênio nos seus sítios ativos(64). Remove hidroperóxidos inorgânicos e orgânicos, reduzindo-os a H_2O ou a álcoois, através de reações acopladas à oxidação da glutathiona, GSH(64). A enzima glutathiona redutase (GR) recicla a glutathiona oxidada (GSSG) no processo de remoção de hidroperóxidos. Possui duas subunidades, cada uma com um domínio FAD e um domínio NADPH em seus sítios ativos(64). Para reduzir a GSSG, a GR utiliza o NADPH, que tem como principal fonte em mamíferos a via das pentoses fosfato, que também pode ser chamada de desvio hexose monofosfato ou via 6-fosfogliconato(65). Na via das pentoses fosfato, duas moléculas de NADPH são formadas na reação catalisada pelas enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfoglicomutase desidrogenase(66). O NADPH também pode ser gerado pelo sistema de

anaplerose e cataplerose dos intermediários do Ciclo de Krebs(35). A enzima málica e a isocitrato desidrogenase citosólica são as principais geradoras de NADPH nesse sistema(67).

A família da enzima glutathione-S-transferase (GST) utiliza primariamente a GSH para conjugar xenobióticos ou material celular danificado. Algumas GSTs exibem atividade parecida com a da GPx, mas apenas em relação a hidroxiperóxidos orgânicos, não sendo capazes de reduzir H_2O_2 , por isso são chamadas de GPx independentes de selênio.

A família da glutaredoxinas (Grx) consiste em oxidoreduases dependentes de GSH. Isoformas da Grx estão presentes em praticamente todos os grupos taxonômicos e possuem alto grau de homologia em sua sequência de aminoácidos(55). Reduzem dissulfetos, dissulfetos mistos, podendo formar GSSG e o grupo sulfidril ou apenas sulfidrilas reduzidas. A Grx oxidada é reduzida por duas moléculas de GSH, sendo esta redução dependente de NADPH(56).

As tireoredoxinas (Trx) são proteínas de baixo peso molecular, que possuem um sítio ativo tiol/dissulfeto e atividade de oxirredução(56, 68). São encontradas em procariontes e eucariontes e existem mais de dez isoformas conhecidas. A Trx 1, citosólica, e a Trx 2, mitocondrial, são incapazes de reparar a atividade catalítica de peroxiredoxinas e Gpxs(69). A Trx 1 reduz diretamente H_2O_2 e GSSG e também é cofator de muitas enzimas como as peroxiredoxinas. As tireoredoxinas redutases (TrxRs) são enzimas dependentes de NADPH, que possuem FAD associado à sua estrutura e que reduzem primariamente os centros ativos dissulfetos nas Trx oxidadas(56). O sistema tireoredoxina, por possuir a capacidade de reduzir as pontes dissulfeto, também participa da regeneração da metionina sulfóxido redutase e de peroxidoredoxinas, na regulação redox de enzimas e de fatores de transcrição(56).

Os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais e melatonina(70), ou exógenos, ingeridos através da dieta regular ou via suplementação, como o ácido ascórbico (vitamina C)(71), o β -caroteno (precursor da vitamina A)(72), o α -tocoferol (vitamina E)(73) e polifenóis em geral.

O equilíbrio entre a produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio é o que consiste o chamado balanço redox. Quando ocorrem alterações no balanço redox intracelular, devido ao aumento da produção de EROs ou ERNs, ou redução da atividade do sistema antioxidante, ou seja, um desequilíbrio entre produção e eliminação de

espécies reativas, cria-se um ambiente que favorece o estresse oxidativo(74). O desbalanço redox pode causar dano celular em uma variedade de condições patológicas, incluindo doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão, doenças inflamatórias, complicações diabéticas, isquemia e doenças neurodegenerativas. No entanto, as EROs não são apenas moléculas nocivas às células, mas também são consideradas responsáveis por inúmeros processos de sinalização que regulam o crescimento, diferenciação, proliferação e morte celular(75, 76). Assim, o entendimento de como as células controlam a produção de EROs e regulam os processos de transdução de sinal são essenciais para a prevenção de doenças e melhora do funcionamento celular.

Sob condições de estresse oxidativo/nitrosativo, os tióis de resíduos de cisteína de proteínas estão entre os principais alvos das moléculas oxidantes e passam por alterações redox reversíveis ou irreversíveis, dependendo da concentração intracelular de EROs e ERNs(77). Os resíduos de cisteína estão presentes no sítio ativo de muitas proteínas, que atuam na regulação e no tráfego de outras macromoléculas, na expressão gênica e na sinalização celular(77). A oxidação de resíduos de cisteína afeta completamente a atividade da proteína e até mesmo sua conformação espacial, o que afeta diretamente sua função biológica. Por outro lado, a exposição das cisteínas na superfície da proteína serve também como sensor redox da célula. Estas alterações redox nos tióis proteicos são facilmente reversíveis através de mecanismos que incluem principalmente a GSH(75, 77).

Em relação à secreção de insulina, o balanço redox está intimamente associado ao processo de secreção de insulina estimulado pela glicose(45). Ivarsson et al (2005) observaram que a glicose aumenta a razão $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ com concomitante aumento da secreção de insulina, sendo esse processo relacionado com a atividade da Grx1(39). O silenciamento da Grx1 reduz drasticamente a secreção de insulina sem afetar o estado redox intracelular, sugerindo que esta possui uma ação localizada de suporte da secreção de insulina(78), uma vez que a superexpressão da Grx1 estimula a exocitose da insulina(78). A razão $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ é importante também no controle da concentração de EROs no ambiente intracelular(45). Qualquer alteração na razão $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ induz um desbalanço na produção e eliminação de EROs culminando em uma alteração do processo da secreção de insulina pelas células β pancreáticas(37, 45). Existem vários sistemas produtores de EROs no meio intracelular nas ilhotas pancreáticas, sendo a enzima NADPH oxidase um dos mais relevantes(79).

1.4 O Complexo NADPH Oxidase

A produção de EROs pela NADPH oxidase era considerada, classicamente, uma propriedade única de células fagocíticas do sistema imunológico, como os neutrófilos, daí a origem do termo *phox*, abreviação de *phagocyte oxidase*. Nessas células, a NADPH oxidase tem como função a produção de grandes quantidades de ânion superóxido para ser utilizado contra microrganismos invasores. No entanto, mais recentemente, vários trabalhos têm mostrado que células não-fagocíticas, como células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas (80, 81) e as células β pancreáticas(79) também expressam a NADPH oxidase (NOX).

Em mamíferos, diversos sistemas têm a capacidade de transferir elétrons para o oxigênio molecular, resultando na formação de superóxido. Estes sistemas incluem o complexo I da cadeia de transporte de elétrons(82), a óxido nítrico sintase(83), as ciclooxygenases(84), as lipoxigenases(85), o citocromo p450 redutase(86) e a xantina oxidase(51). No entanto, somente a NOX tem como função primordial a produção de EROs(87, 88). A formação de EROs, além de contribuir com o sistema de defesa do organismo, também regula a fosforilação de cinases, a oxidação de fosfatases, a ativação de fatores de transcrição e a mobilização do transporte iônico(89).

A NOX 2 é uma enzima heteromultimérica formada por proteínas localizadas na membrana plasmática e no citoplasma (**Figura 3**)(50). As proteínas associadas à membrana formam uma flavohemeproteína heterodimérica conhecida como citocromo b_{558} (absorção máxima em 588 nm), que se encontra ligada a vesículas secretórias e grânulos citoplasmáticos e que é constituída pelos componentes $gp91^{phox}$ (glicoproteína) e $p22^{phox}$. A associação entre $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$ se dá na proporção 1:1 e somente a união destas duas subunidades gera um complexo estável para a ancoragem dos outros componentes da enzima(90). Os demais componentes ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$, além das subunidades Rac e RhoGDI) são citosólicos. A separação desses componentes, citosólicos e de membrana, garante que a oxidase permaneça inativa(87).

Figura 3 - Estrutura da enzima NADPH oxidase em seus estados basal (esquerda) e ativado (direita).

Fonte: McCann, S. K. 2013. (91)

O descobrimento da NOX se deu através de uma doença rara ligada ao cromossomo X que gera imunodeficiência, chamada doença granulomatosa crônica ou CGD. O nome deriva do fato de a doença gerar uma quantidade excessiva de granuloma nos pacientes. A formação de proteínas defeituosas entre os componentes da NOX acaba impedindo a produção de superóxido pelas células fagocíticas, que ficam incapazes de matar microrganismos invasores. Por este motivo, tal doença acabou se mostrando uma fonte valiosa de estudo para a descrição da enzima e suas subunidades (50, 92)

A subunidade $gp91^{phox}$ é uma proteína com massa molecular aparente de aproximadamente 70-90 KDa. É formada por seis regiões transmembrana alfa-hélices em sua parte N-terminal, enquanto sua parte C-terminal é citoplasmática e possui os domínios de ligação ao FAD e NADPH. Aparentemente, a $gp91^{phox}$ possui três pontos de glicosilação em resíduos de asparagina localizados no segundo e terceiro *loops* extracelulares. Os carboidratos envolvidos são a N-acetilglicosamina e a galactose, e em menor concentração a frutose, a manose e a glicose(93, 94). Nas terceira e quinta hélices da proteína estão dois resíduos de histidina que são os prováveis ligantes de ferro de dois grupos hemes não

idênticos, sendo um externo à membrana e outro interno, com posicionamento paralelo à superfície da mesma. Desse modo, os elétrons são transferidos do NADPH citoplasmático para o FAD através da membrana, até o oxigênio molecular pelos grupamentos hemes, produzindo o radical superóxido(94). Estudos mostram que o NADH também pode ser usado como substrato para a redução de O₂. No entanto, a NOX possui um K_m de 2.5 mM para o NADH e um K_m de 40-45 μM para o NADPH(95), o que favorece grandemente a utilização do NADPH. O componente gp91^{phox} também pode ser fosforilado durante sua ativação pela PKC, intensificando a interação com as demais subunidades e consequentemente potencializando a produção do superóxido(96).

A gp91^{phox} se associa na membrana plasmática com a proteína transmembrânica p22^{phox} de 22 KDa. A p22^{phox} é formada por duas alfa-hélices e suas extremidades C e N-terminal estão voltadas para o citoplasma(92). É uma proteína associada à membrana, não glicosilada, que possui a função de estabilizar a subunidade catalítica da NOX (97). A região C-terminal da p22^{phox} possui uma região rica em prolina (PRR) que serve de ancoramento para a p47^{phox} (97). A p47^{phox}, quando fosforilada, migra do citoplasma para a membrana plasmática com as demais subunidades, promovendo a ativação da oxidase.

Para a NOX tornar-se ativa, um processo bem coordenado de fosforilação, ativação de GTPase e interação entre proteínas deve ocorrer, sendo cada uma dessas etapas possíveis pontos de regulação para ativação da enzima(98). Quando ocorre algum estímulo para ativação da NOX, os dois alvos a serem fosforilados são a p47^{phox} e RhoGDI, que sofrem mudanças estruturais e permitem a migração dos componentes citosólicos para a membrana.

A p47^{phox} é uma subunidade da NOX que possui duas regiões SH3 (*Src homology 3*), uma PRR e um domínio PX, ou de homologia à *phox*. As regiões SH3 interagem com a PRR do componente p22^{phox}, a PRR permite a interação com a p67^{phox} e o domínio PX facilita a ligação a fosfolipídios de membrana, mais especificamente o fosfatidil-inositol-(3,4) bifosfato ou PtdIns(3,4)(99). Entretanto, o domínio SH3 no estado basal, assim como o PX, está encoberto pela AIR, ou região auto-inibitória, que possui vários sítios de fosforilação, localizada na porção C-terminal da proteína (100) (**Figura 4A**). Quando a AIR é fosforilada nos resíduos de serina por cinases, como PKC, Akt, p38, MAP (*mitogen-activated protein kinase* e PAK (*p21-activated kinase*) (88, 101, 102), ocorre uma mudança estrutural da p47^{phox} e a liberação dos domínios SH3 e PX, permitindo a ligação com a região RRP da

p22^{phox} e com fosfolipídios de membrana respectivamente(103). Assim, a p47^{phox} é chamada de “subunidade organizadora”, pois embora não possua atividade catalítica, quando fosforilada cria condições para que a p67^{phox}, “subunidade ativadora”, se associe com a gp91^{phox}.

A subunidade p67^{phox} possui em sua região N-terminal várias repetições tetratricopeptídeos (TPR) *in tandem*, que interagem com a Rac (**Figura 4B**). Também possui a região de ativação (AD), que interage com a gp91^{phox}. A p67^{phox} interage com a p47^{phox} através de um domínio SH3(104). Além disso, possui um domínio *P_{hox}* e um *Bem1*, ou PB1, de interação com a p40^{phox}. O componente p40^{phox} também possui um domínio PB1, com o qual interage com p67^{phox}, um domínio SH3, de interação com a p47^{phox} e um domínio PX, de interação com fosfatidil-inositol-trisfosfato(92).

A subunidade p40^{phox} parece exercer um papel importante no complexo NOX, uma vez que foi verificada a redução da produção de EROs em camundongos *Knockout* para essa subunidade(105). A p40^{phox} também pode ser fosforilada nos resíduos Thr154 e Ser315, o que é mediado em sua maior parte pela família das PKCs(106). No entanto, a importância da fosforilação da p40^{phox} ainda é desconhecida, e os dados da literatura são contraditórios: já se demonstrou que ela pode promover uma regulação negativa na função da NOX(107) ou facilitar a translocação da p67^{phox} e p47^{phox} para a membrana, potencializando a produção de superóxido(108, 109).

A RhoGDI, quando fosforilada, permite a reposição do GTP na Rac, o que a torna ativa. A Rac-GTP migra independentemente para a membrana, mas de maneira coordenada com a p47^{phox} e a p67^{phox} e auxilia na ativação do centro catalítico através da sua interação direta com a oxidase e/ou com a p67^{phox} (98, 110). A ligação da Rac com a p67^{phox} ocorre no domínio TPR e é essencial para a ativação da NOX(111).

Figura 4 – Ilustração das interações moleculares entre as subunidades da NADPH oxidase.

Fonte: Bedard e Krause 2007(92)

Algumas subunidades que compõem a NOX possuem variantes de acordo com o tecido de expressão ou espécie analisada. Uma família de proteínas chamada NOX/DUOX possui sete membros, sendo todas proteínas homólogas à gp91^{phox}, que passou a ser chamada de NOX2. As outras são NOX1, 3, 4 e 5 e DUOX1 e 2. A NOX1 é encontrada no colón, cérebro e em células vasculares; a NOX2 em células fagocíticas do sistema imune; NOX3 no ouvido interno; NOX4 nos rins, osso e células sanguíneas; NOX5 em tecidos linfóides e nos testículos e as DUOX na tireóide(92, 110). Elas diferem basicamente na dependência ou não de ativadores, na necessidade da subunidade p22^{phox} para sua estabilização, de cofatores citoplasmáticos e de cálcio e na presença ou não de domínios *EF-hands*, que são responsáveis pela ligação ao cálcio e consequente modulação pelo mesmo (92, 112) (**Figura 5**).

Além dessas proteínas homólogas à gp91^{phox}, outras duas subunidades também apresentam mais de uma isoforma, a p47^{phox} e a p67^{phox}. A NOXO1 ou Proteína Organizadora de NOX, apesar de apresentar função semelhante à p47^{phox}, não possui a região de auto inibição, fazendo com que a NOX dependente dessa subunidade fique constitutivamente ativa. A NOXA1 ou Proteína Ativadora de NOX, consiste no homólogo da p67^{phox} (**Figura 5**), sendo que nem todas as NOX dependem dessas subunidades para a produção de superóxido(113).

Figura 5 - Estrutura da família de enzimas NOX/DOUX. Enquanto NOX 1, 2, 3 e 4 são dependentes de p22^{phox}, a NOX5 e as DUOX não. Essas isoformas não necessitam de subunidades regulatórias e são moduladas pelo cálcio, pois possuem o domínio EF Hands de ligação ao íon.

FONTE: Drummond, G. R. 2011 (114)

Quanto ao destino do superóxido produzido pela NOX, é sabido que nas células fagocíticas, em seu estado inativo, a maior parte do flavocitocromo b₅₅₈ é encontrado na membrana de vesículas citoplasmáticas e, ao ocorrer sua ativação, as vesículas são fundidas à membrana e a produção de superóxido ocorre no exterior da célula(92). O superóxido produzido retorna à célula utilizando-se dos canais 3 para cloreto, enquanto que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) oriundo de sua dismutação pela superóxido dismutase extracelular (SOD-EC), adentra a célula através de aquaporinas (**Figura 6**)(115).

Figura 6 – Ilustração mostrando como as EROs produzidas pela NADPH oxidase podem adentrar as células. Fonte: Fisher, A.B. 2009 (115)

Para melhor compreensão da participação da NOX nas funções fisiológicas do organismo, a utilização de inibidores se mostra como uma ferramenta de grande importância. Existem diversos inibidores farmacológicos para a NOX; no entanto, poucos são os que possuem ações diretas sobre o complexo enzimático. Apesar de certas limitações, a droga mais utilizada nos trabalhos constantes na literatura é o DPI (difênileneiodônio). Inicialmente, o DPI foi identificado com um supressor da gliconeogênese, por reduzir a oxidação de substratos na mitocôndria(116). Em estudos posteriores descobriu-se seu papel na inibição NOX. Sua atividade está associada à abstração do elétron durante o transporte do mesmo, criando um radical fenil que através de ligação covalente bloqueia seu fluxo até o O₂ (117, 118). Sua utilização apresenta restrições devido à sua inespecificidade, pois ele age em outras enzimas portadoras do grupamento FAD, como a NO sintase, complexo I da mitocôndria, xantina oxidase e citocromo P450 redutase.

Outro inibidor da NADPH oxidase é a apocinina, também conhecida como acetovanilona (4'-hidroxi-3'-metoxiacetofenona), e isolada inicialmente das raízes da planta *Apocynum cannabinum* (maconha canadense)(119). A apocinina inibe com mais eficiência a atividade da NOX2, podendo atuar também sobre a NOX4 e a NOX5, pois bloqueia a

associação da $p47^{phox}$ com os componentes de membrana (citocromo b588). Estudos têm mostrado que a apocinina é uma pró-droga que, quando oxidada por peroxidases, é convertida em um metabólito mais potente que a própria apocinina(120).

Por fim, um dos inibidores mais recentes descritos na literatura, VAS2870, um composto inicialmente desenvolvido pela empresa Vasopharm GmbH, apresenta ação principalmente sobre a NOX2. Estudos mostram que o VAS2870 interage com os componentes NOX2 e $p22^{phox}$, e parece não interferir na organização das demais subunidades, nas vias de sinalização e não apresentar ações antioxidantes. Contudo, ainda não foi estabelecido especificamente o mecanismo de ação dessa substância. Atualmente, sabe-se que o VAS2870 tem um efeito secundário na alquilação do receptor RyR1(121).

A produção de EROs pela NOX e pelos demais sistemas descritos anteriormente pode alterar o balanço redox intracelular e ativar vias de sinalização, desencadeando funções biológicas em um processo similar ao mecanismo reversível de fosforilação de proteínas. Além disso, as espécies reativas são capazes de realizar modificações de oxidação-redução (redox) em diversas biomoléculas. Dentre elas, por exemplo, o superóxido modula o grupamento ferro-enxofre que altera a atividade de enzimas; o H_2O_2 promove a oxidação dos grupamentos tióis de proteínas; e óxido nítrico interage com os grupamentos heme, também alterando a atividade enzimática(122). É bem aceito que o H_2O_2 consiste na principal molécula de sinalização redox(123). Isso pode ser atribuído ao fato de que o H_2O_2 é uma molécula estável, pequena, presente em diversos tecidos e com alto potencial de difusão, além de ser produzida e eliminada rapidamente(123, 124). No entanto, a maior ressalva em considerar as reações redox como via de sinalização é a falta de especificidade dos alvos a serem oxidados e o potencial efeito deletério que essas moléculas apresentam sobre o DNA e lipídeos(125). Dentre as moléculas a serem oxidadas, as proteínas são as principais, com aproximadamente 70% dos eventos de oxidação; os lipídeos constituem 18% e os ácidos nucleicos, menos de 15%.

Uma das funções mais importantes mediada pelas EROs produzidas via NOX é a capacidade de modificar o potencial de membrana através de sua atividade eletrogênica e pela geração de H^+ . Acreditava-se que a $gp91^{phox}$ pudesse promover o transporte de H^+ através da membrana(126). Entretanto, foram descobertos genes para canais de prótons intimamente associados à NOX fagocítica, que compensam a despolarização e a acidificação do pH citoplasmático causadas pela sua atividade(112).

Outro exemplo é a oxidação de proteínas induzindo a S-glutationilação. O aumento na concentração de EROs modifica o estado redox do ambiente intracelular, que é normalmente reduzido, tornando-o mais oxidativo. A oxidação do grupamento tiol em resíduos de cisteínas com baixo pKa leva a formação reversível de dissulfetos mistos entre grupos sulfidril de proteínas e da glutathione, processo esse chamado S-glutationilação. A S-glutationilação inibe a atividade de proteínas com grupamento tiol, porém garante, por outro lado, a reversibilidade da oxidação e impede a inativação irreversível mediada pelo ácido sulfênico, com consequente formação dos ácidos sulfínico e sulfônico, culminando com a degradação proteica(127). A S-glutationilação está envolvida em muitos processos fisiológicos como crescimento, progressão do ciclo celular, atividade transcricional, funções do citoesqueleto e metabolismo, o que sugere que este possa ser o mecanismo geral da sinalização redox. Assim, é possível que a formação de EROs mediada pela NOX seja de fundamental importância na regulação de diversos processos fisiológicos e metabólicos também em células não-fagocíticas, como as células β pancreáticas.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que ilhotas pancreáticas isoladas expressam a NOX e suas subunidades, com formação de ânion radical superóxido quando estimuladas com PMA(79). Posteriormente, Uchizono et al. (2006) verificaram através de experimentos realizados com RT-PCR e posterior sequenciamento que, além de NOX2, há também a expressão de $p22^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$, NOX1, NOX4, NOXO1 e NOXA1 nessas mesmas estruturas (128).

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de identificar a função da NOX em ilhotas pancreáticas e uma possível participação deste complexo enzimático no processo de secreção de insulina. Inicialmente, Morgan et al. (2007) evidenciaram que a NADPH oxidase pode ter sua atividade e expressão moduladas por glicose, citocinas e palmitato, tanto em células β primárias quanto em ilhotas pancreáticas de ratos(129). Imoto et al. (2008) verificaram que a alteração provocada pelo DPI sobre a funcionalidade da ilhota está relacionada a uma alteração na concentração intracelular de cálcio e sugeriram que a NOX pode modular a concentração deste íon nas células β pancreáticas(130). Em estudo posterior, Morgan et al. (2009) demonstraram que a inibição da enzima utilizando DPI ou oligonucleotídeo *anti-sense* para $p47^{phox}$ provocou redução da secreção de insulina estimulada por glicose, o que foi acompanhado por uma diminuição da resposta de cálcio intracelular, da oxidação da glicose, da expressão gênica do transportador de glicose 2

(GLUT2) e da glicoquinase(44). Entretanto, atualmente, nosso grupo de pesquisa está redefinindo a participação da NOX no processo de secreção de insulina. Corroborando nossos resultados atuais, Li et al. (2012) verificaram que animais knockout para a NOX2 apresentam aumento da secreção de insulina e que esse processo é regulado pelo sistema de AMPc/PKA, um dos principais reguladores da via de amplificação da secreção de insulina(131).

6 CONCLUSÃO

A desregulação do sistema relógio ocasionada pela diminuição da expressão de Bmal1 leva a um aumento da expressão e atividade da NADPH oxidase, ocasionando a elevação do conteúdo de superóxido intracelular, tanto em linhagem celular secretora de insulina, como em ilhotas isoladas de camundongos *knockout* para Bmal1 nas células β pancreáticas. O aumento da produção de superóxido por esta via é acompanhado por uma maior atividade de enzimas antioxidantes, como SOD e catalase, possivelmente na tentativa de reverter o ambiente oxidativo induzido pela NADPH oxidase. Por outro lado, a concentração de GSH encontra-se diminuída, o que possivelmente reduz sua utilização para a regeneração do sistema antioxidante da glutathione, contribuindo ainda mais para o desbalanço redox nestas células. Esse conjunto de alterações diminuiu ainda a atividade da aconitase, ocasionando a queda da razão ATP/ADP citoplasmática e um prejuízo na secreção de insulina. Por outro lado, o aumento exacerbado da quantidade de EROs levou também a uma redução da viabilidade celular, o que pode ter consistido em um fator adicional para a queda na secreção de insulina nestas células.

Com os resultados obtidos em nosso trabalho, portanto, concluímos que os genes relógio, através da regulação da enzima NADPH oxidase, são capazes de modular o estado redox intracelular, alterando a atividade de enzimas envolvidas no processo de metabolismo da glicose e a produção de metabólitos que são essenciais para o mecanismo de secreção de insulina. Esse estudo indica uma via adicional de controle da função da célula β pancreática, essencial para a melhora da compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do diabetes.

REFERÊNCIAS¹

1. Schibler U, Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell*. 2002;111(7):919-22.
2. Duguay D, Cermakian N. The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int*. 2009;26(8):1479-513.
3. Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):886-96.
4. Bunney WE, Bunney BG. Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22(4):335-45.
5. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 1990;247(4945):975-8.
6. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*. 1995;14(4):697-706.
7. Morse D, Sassone-Corsi P. Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends Neurosci*. 2002;25(12):632-7.
8. Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, et al. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci*. 2002;22(1):350-6.
9. Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED. The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 2004;24(3):615-9.
10. Lamont EW, Robinson B, Stewart J, Amir S. The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(11):4180-4.
11. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*. 2001;293(5529):506-9.

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>

12. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010;466(7306):627-31.
13. Quintero JE, Kuhlman SJ, McMahon DG. The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J Neurosci*. 2003;23(22):8070-6.
14. Cermakian N, Sassone-Corsi P. Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12(4):359-65.
15. Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. *Cell*. 2008;134(5):728-42.
16. Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):47-56.
17. Chen L, Yang G. Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system. *Front Pharmacol*. 2015;6:71.
18. Dardente H, Cermakian N. Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int*. 2007;24(2):195-213.
19. Rutter GA. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med*. 2001;22(6):247-84.
20. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol*. 2014;5:285.
21. Wang TA, Yu YV, Govindaiah G, Ye X, Artinian L, Coleman TP, et al. Circadian rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons. *Science*. 2012;337(6096):839-42.
22. Osaki T, Uchida Y, Hirayama J, Nishina H. Diphenyleneiodonium chloride, an inhibitor of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in zebrafish. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(8):1343-7.
23. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*. 2006;20(14):1868-73.
24. Marcheva B, Ramsey KM, Bass J. Circadian genes and insulin exocytosis. *Cell Logist*. 2011;1(1):32-6.
25. Sadacca LA, Lamia KA, deLemos AS, Blum B, Weitz CJ. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia*. 2011;54(1):120-4.
26. Lee J, Kim MS, Li R, Liu VY, Fu L, Moore DD, et al. Loss of Bmal1 leads to uncoupling and impaired glucose-stimulated insulin secretion in β -cells. *Islets*. 2011;3(6):381-8.

27. Lee J, Moulik M, Fang Z, Saha P, Zou F, Xu Y, et al. Bmal1 and β -cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress-induced β -cell failure in mice. *Mol Cell Biol*. 2013;33(11):2327-38.
28. Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol*. 2000;11(4):267-75.
29. Keane K, Newsholme P. Metabolic regulation of insulin secretion. *Vitam Horm*. 2014;95:1-33.
30. Newsholme P, Cruzat V, Arfuso F, Keane K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. *J Endocrinol*. 2014;221(3):R105-20.
31. Henquin JC. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;93 Suppl 1:S27-31.
32. Thorens B. GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol*. 2001;18(4):265-73.
33. Haber EP, Ximenes HM, Procopio J, Carvalho CR, Curi R, Carpinelli AR. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta-cells. *J Cell Physiol*. 2003;194(1):1-12.
34. Matschinsky FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*. 1996;45(2):223-41.
35. Jensen MV, Joseph JW, Ronnebaum SM, Burgess SC, Sherry AD, Newgard CB. Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(6):E1287-97.
36. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000;49(11):1751-60.
37. 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.
38. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(8):347-54.
39. 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.
40. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*. 2009;52(5):739-51.

41. Jones PM, Persaud SJ, Howell SL. Ca²⁺(+)-induced insulin secretion from electrically permeabilized islets. Loss of the Ca²⁺(+)-induced secretory response is accompanied by loss of Ca²⁺(+)-induced protein phosphorylation. *Biochem J.* 1992;285 (Pt 3):973-8.
42. Nesher R, Anteby E, Yedovizky M, Warwar N, Kaiser N, Cerasi E. Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes.* 2002;51 Suppl 1:S68-73.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Halliwell B. The chemistry of free radicals. *Toxicol Ind Health.* 1993;9(1-2):1-21.
47. Bachi A, Dalle-Donne I, Scaloni A. Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chem Rev.* 2013;113(1):596-698.
48. Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature.* 1983;306(5940):284-7.
49. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc).* 2005;70(2):200-14.
50. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93(5):1464-76.
51. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.* 2006;58(1):87-114.
52. Kurohane Kaneko Y, Ishikawa T. Dual role of nitric oxide in pancreatic β -cells. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(4):295-300.
53. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13.
54. Gutteridge JM, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393(4):561-4.
55. Fernandes AP, Holmgren A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(1):63-74.
56. Kalinina EV, Chernov NN, Saprin AN. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc).* 2008;73(13):1493-510.

57. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem.* 1999;274(20):13908-14.
58. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049-55.
59. Prohaska JR, Sunde RA. Comparison of liver glutathione peroxidase activity and mRNA in female and male mice and rats. *Comp Biochem Physiol B.* 1993;105(1):111-6.
60. Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA, Getzoff ED. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry.* 2004;43(25):8038-47.
61. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol.* 1998;201(Pt 8):1203-9.
62. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3143-53.
63. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(9-10):922-35.
64. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3289-303.
65. Horecker BL. The biochemistry of sugars. *Int Z Vitam Ernahrungsforsch Beih.* 1976;15:1-21.
66. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MM, Campbell K, Cheung E, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2014.
67. Pongratz RL, Kibbey RG, Shulman GI, Cline GW. Cytosolic and mitochondrial malic enzyme isoforms differentially control insulin secretion. *J Biol Chem.* 2007;282(1):200-7.
68. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:75-87.
69. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life.* 2001;52(1-2):35-41.
70. Reiter RJ, Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX. Melatonin in relation to the "strong" and "weak" versions of the free radical theory of aging. *Adv Med Sci.* 2008;53(2):119-29.
71. Oliveira R, Geraldo D, Bento F. Radical scavenging activity of antioxidants evaluated by means of electrogenerated HO radical. *Talanta.* 2014;129:320-7.
72. Getoff N. Vitamin-induced intracellular electrons are the mechanism for their well-known beneficial effects: a review. *Nutrition.* 2013;29(4):597-604.

73. Sharma R, Vinayak M. α -Tocopherol prevents lymphoma by improving antioxidant defence system of mice. *Mol Biol Rep.* 2013;40(2):839-49.
74. Ellis EM. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther.* 2007;115(1):13-24.
75. Jung T, Bader N, Grune T. Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch Biochem Biophys.* 2007;462(2):231-7.
76. Sart S, Song L, Li Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:105135.
77. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(6):883-98.
78. 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.
79. 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.
80. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74(6):1141-8.
81. Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept.* 2000;91(1-3):21-7.
82. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev.* 2007;39(2-3):443-55.
83. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9220-5.
84. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):387-437.
85. Wittwer J, Hersberger M. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;77(2):67-77.
86. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;199(3):316-31.
87. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(1):42-7.

88. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-9.
89. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):339-52.
90. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(5):578-84.
91. McCann SK, Roulston CL. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. *Brain Sci.* 2013;3(2):561-98.
92. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313.
93. Harper AM, Chaplin MF, Segal AW. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J.* 1985;227(3):783-8.
94. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(9):1428-59.
95. Clark RA, Leidal KG, Pearson DW, Nauseef WM. NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J Biol Chem.* 1987;262(9):4065-74.
96. Raad H, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, et al. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J.* 2009;23(4):1011-22.
97. Dinanuer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 1990;86(5):1729-37.
98. Bokoch GM, Zhao T. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1533-48.
99. Leto TL, Adams AG, de Mendez I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(22):10650-4.
100. Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, et al. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(8):4474-9.
101. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(5):R1014-30.

102. Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*. 2002;41(24):7743-50.
103. Ago T, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H. Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*. 1999;274(47):33644-53.
104. Hata K, Takeshige K, Sumimoto H. Roles for proline-rich regions of p47phox and p67phox in the phagocyte NADPH oxidase activation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241(2):226-31.
105. Ellson CD, Davidson K, Ferguson GJ, O'Connor R, Stephens LR, Hawkins PT. Neutrophils from p40phox^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J Exp Med*. 2006;203(8):1927-37.
106. Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV, Fuchs A. p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem*. 1998;273(46):30097-103.
107. Lopes LR, Dagher MC, Gutierrez A, Young B, Bouin AP, Fuchs A, et al. Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochemistry*. 2004;43(12):3723-30.
108. Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, et al. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J*. 2002;21(23):6312-20.
109. Ellson C, Davidson K, Anderson K, Stephens LR, Hawkins PT. PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation. *EMBO J*. 2006;25(19):4468-78.
110. Nauseef WM. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem*. 2008;283(25):16961-5.
111. Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem*. 1998;273(27):16663-8.
112. Bedard K, Lardy B, Krause KH. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie*. 2007;89(9):1107-12.
113. Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther*. 2008;120(3):254-91.
114. 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.

115. Fisher AB. Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(6):1349-56.
116. Holland PC, Clark MG, Bloxham DP, Lardy HA. Mechanism of action of the hypoglycemic agent diphenyleneiodonium. *J Biol Chem*. 1973;248(17):6050-6.
117. O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J*. 1993;290 (Pt 1):41-9.
118. O'Donnell VB, Smith GC, Jones OT. Involvement of phenyl radicals in iodonium inhibition of flavoenzymes. *Mol Pharmacol*. 1994;46(4):778-85.
119. Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:106507.
120. Ximenes VF, Kanegae MP, Rissato SR, Galhiane MS. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch Biochem Biophys*. 2007;457(2):134-41.
121. Sun QA, Hess DT, Wang B, Miyagi M, Stamler JS. Off-target thiol alkylation by the NADPH oxidase inhibitor 3-benzyl-7-(2-benzoxazolyl)thio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidine (VAS2870). *Free Radic Biol Med*. 2012;52(9):1897-902.
122. Winterbourn CC. Are Free Radicals Involved in Thiol-Based Redox Signaling? *Free Radic Biol Med*. 2014.
123. Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Misalski Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol*. 2007;54(1):39-50.
124. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(8):994-1003.
125. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5 Suppl):715S-24S; discussion 24S-25S.
126. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007;19(9):1807-19.
127. Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ. Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(3-4):348-66.
128. 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.

129. 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.
130. Imoto H, Sasaki N, Iwase M, Nakamura U, Oku M, Sonoki K, et al. Impaired insulin secretion by diphenyleneiodium associated with perturbation of cytosolic Ca²⁺ dynamics in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2008;149(11):5391-400.
131. 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.
132. Gamble KL, Berry R, Frank SJ, Young ME. Circadian clock control of endocrine factors. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(8):466-75.
133. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*. 1992;130(1):167-78.
134. Janjic D, Maechler P, Sekine N, Bartley C, Annen AS, Wolheim CB. Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. *Biochem Pharmacol*. 1999;57(6):639-48.
135. 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.
136. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(11):1359-68.
137. Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(2):372-82.
138. Anea CB, Cheng B, Sharma S, Kumar S, Caldwell RW, Yao L, et al. Increased superoxide and endothelial NO synthase uncoupling in blood vessels of Bmal1-knockout mice. *Circ Res*. 2012;111(9):1157-65.
139. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol*. 2004;2(11):e377.
140. 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.
141. Anea CB, Zhang M, Chen F, Ali MI, Hart CM, Stepp DW, et al. Circadian clock control of Nox4 and reactive oxygen species in the vasculature. *PLoS One*. 2013;8(10):e78626.

142. Martens GA, Cai Y, Hinke S, Stangé G, Van de Castele M, Pipeleers D. Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 2005;280(21):20389-96.
143. Ronnebaum SM, Ilkayeva O, Burgess SC, Joseph JW, Lu D, Stevens RD, et al. A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30593-602.
144. Lenzen S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *J Biol Chem.* 2014;289(18):12189-94.
145. 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.
146. Fransson U, Rosengren AH, Schuit FC, Renström E, Mulder H. Anaplerosis via pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 2006;49(7):1578-86.
147. Guay C, Madiraju SR, Aumais A, Joly E, Prentki M. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem.* 2007;282(49):35657-65.
148. Newsholme P, Rebelato EL, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli AR, Curi R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses and β -cell function: a critical role for amino acids. *J Endocrinol.* 2012.
149. Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life.* 2012;64(5):362-9.
150. Frazziano G, Al Ghouleh I, Baust J, Shiva S, Champion HC, Pagano PJ. Nox-derived ROS are acutely activated in pressure overload pulmonary hypertension: indications for a seminal role for mitochondrial Nox4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306(2):H197-205.
151. Ago T, Matsushima S, Kuroda J, Zablocki D, Kitazono T, Sadoshima J. The NADPH oxidase Nox4 and aging in the heart. *Aging (Albany NY).* 2010;2(12):1012-6.
152. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(7):1289-301.
153. 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.
154. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 3):343-7.

155. Lind C, Gerdes R, Schuppe-Koistinen I, Cotgreave IA. Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247(2):481-6.
156. Bulteau AL, Ikeda-Saito M, Szweda LI. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry*. 2003;42(50):14846-55.
157. Lushchak OV, Piroddi M, Galli F, Lushchak VI. Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species. *Redox Rep*. 2014;19(1):8-15.
158. Panten U, Rustenbeck I. Fuel-induced amplification of insulin secretion in mouse pancreatic islets exposed to a high sulfonylurea concentration: role of the NADPH/NADP⁺ ratio. *Diabetologia*. 2008;51(1):101-9.
159. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802-12.
160. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch*. 2010;460(4):703-18.