

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Laboratório de Estudo dos Mecanismos de Morte da Célula β

DAVIDSON CORREA DE ALMEIDA

**Expressão, localização e modulação de NADPH oxidases por citocinas pró-inflamatórias
na célula β pancreática**

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

São Paulo
2022

DAVIDSON CORREA DE ALMEIDA

**Expressão, localização e modulação de NADPH oxidases por citocinas pró-inflamatórias
na célula β pancreática**

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

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento.

Orientadora: Fernanda Ortis.

Versão corrigida

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Almeida, Davidson Correa de
Expressão, localização e modulação de NADPH
oxidases por citocinas pró-inflamatórias na célula
beta pancreática / Davidson Correa de Almeida;
orientadora Fernanda Ortis. -- São Paulo, 2022.
110 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diabetes mellitus. 2. Inflamação. 3. Células
beta pancreáticas. 4. Estresse oxidativo. 5. NADPH
oxidases. I. Ortis, Fernanda, orientador. II.
Título.

RESUMO

ALMEIDA, D. C. **Expressão, localização e modulação de NADPH oxidases por citocinas pró-inflamatórias na célula β pancreática.** 2022. 110 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O Diabetes *mellitus* é caracterizado por hiperglicemia crônica, resultado de deficiência na secreção de insulina; associado ou não a resistência à sua ação. O Diabetes *mellitus* do tipo 1 é a forma autoimune da doença. As células β pancreáticas secretoras de insulina são destruídas pelo ataque autoimune, mediado por inflamação das ilhotas de Langerhans e liberação de citocinas pró-inflamatórias. A morte induzida por citocinas é mediada, principalmente, por estresse de retículo endoplasmático (RE) e estresse oxidativo. NADPH oxidases (NOX) são isoenzimas geradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) e participam na sinalização redox e estresse oxidativo. A família NOX tem sete representantes: NOX1-5 e DUOX1-2. Células β expressam NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5. Nesse tecido, essas enzimas contribuem para a secreção de insulina e a morte induzida por citocinas. Contudo, o papel de NOX na fisiopatologia de células β ainda não é bem resolvido. Além disso, a expressão das isoformas DUOX1 e DUOX2 nunca foi estudada neste tipo celular. Portanto, a proposta deste trabalho foi investigar a expressão de NOX em células β quanto: a presença de DUOX1 e DUOX2; a localização subcelular de todas isoformas; e a modulação de isoformas por citocinas. Mostramos a expressão de DUOX1 e DUOX2 em células β de rato. Citocinas induzem a expressão de DUOX1, DUOX2, *Nox1* e *Nox2* em INS-1E. A expressão de DUOX em células β pode indicar a sua participação na regulação da secreção de insulina e na homeostasia do RE via produção de ROS e modulação do transporte de Ca^{2+} . Isso é corroborado pela indução da sua expressão por citocinas. Esses dados também sugerem que a indução de *Nox* por citocinas tem caráter cronologicamente transiente; ocorrendo após períodos intermediários de exposição ao insulto. Finalmente, padronizamos a imunocitoquímica para isoformas NOX em INS-1E. Identificamos a distribuição citoplasmática de DUOX1 e DUOX2 e a colocalização de NOX2 com insulina, sugerindo a localização de DUOX no RE e a regulação da maquinaria secretora por NOX2.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. Inflamação. Células β pancreáticas. Estresse oxidativo. NADPH oxidases.

ABSTRACT

ALMEIDA, D. C. **Expression, localization and modulation of NADPH oxidases by proinflammatory cytokines in the pancreatic β cell.** 2022. 110 p. Dissertation (Masters thesis in Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Diabetes mellitus is characterized by chronic hyperglycemia, resulting from a deficiency in insulin secretion; associated or not with resistance to its action. Type 1 diabetes mellitus is the autoimmune form of the disease. Insulin-secreting pancreatic β cells are destroyed by the autoimmune attack, mediated by inflammation of islets of Langerhans and release of proinflammatory cytokines. Cytokine-induced death is mediated mainly by endoplasmic reticulum (ER) stress and oxidative stress. NADPH oxidases (NOX) are reactive oxygen species (ROS)-generating isoenzymes that participate in redox signaling and oxidative stress. The NOX family has seven members: NOX1-5 and DUOX1-2. β cells express NOX1, NOX2, NOX4 and NOX5. In this tissue, these enzymes contribute to insulin secretion and cytokine-induced death. However, the role of NOX in β cell (patho)physiology is not yet well explained. Furthermore, expression of DUOX1 and DUOX2 isoforms has never been studied in this cell type. Hence, the purpose of this work was to investigate NOX expression in β cells regarding: the presence of DUOX1 and DUOX2; the subcellular localization of all isoforms; and the modulation of isoforms by cytokines. We show expression of DUOX1 and DUOX2 in rat β cells. Cytokines induce expression of DUOX1, DUOX2, *Nox1* and *Nox2* in INS-1E. DUOX expression in β cells may indicate its participation in regulating insulin secretion and ER homeostasis via ROS production and modulation of Ca^{2+} transport. This is supported by the induction of their expression by cytokines. These data also suggest that cytokine-induced increased *Nox* expression is chronologically transient; occurring after intermediate periods of exposure to the insult. Finally, we standardized the immunocytochemistry for NOX isoforms in INS-1E. We identified the cytoplasmic distribution of DUOX1 and DUOX2 and the colocalization of NOX2 with insulin, suggesting DUOX localization in the ER and NOX2 regulation of the secretory machinery.

Keywords: Diabetes mellitus. Inflammation. Pancreatic β cells. Oxidative stress. NADPH oxidases.

1 INTRODUÇÃO

O pâncreas é uma víscera abdominal retroperitoneal posicionada no plano mediano do corpo humano. Mede 12-15 cm em comprimento e pesa 40-150 g no adulto. É incompletamente dividido em lóbulos por septos de tecido conjuntivo penetrando a víscera e é anatomicamente dividido em processo uncinado, cabeça, pescoço, corpo e cauda (HULL; KAHN, 2015; RELA; REDDY, 2015). É uma glândula mista associada ao trato gastrointestinal: dividido histologicamente e fisiologicamente em pâncreas exócrino e endócrino (ROSS; PAWLINA, 2015). O pâncreas endócrino é representado pelas ilhotas de Langerhans: 1-3 milhões de microglândulas (100-200 μm de diâmetro) cordonais dispersas pelo pâncreas (MESCHER, 2013; ROSS; PAWLINA, 2015). As ilhotas são aproximadamente 1-2% (1-2 g) do volume da víscera e abrigam 2000-4000 células cada. Apesar da massa relativamente menor, o pâncreas endócrino é ricamente vascularizado: recebe 15% do suprimento sanguíneo da víscera toda (BONNER-WEIR, 2005; HULL; KAHN, 2015).

Existem principalmente cinco tipos celulares nas ilhotas: células α , secretoras de glucagon; células β , secretoras de insulina; células δ , secretoras de somatostatina; células ϵ , secretoras de grelina; e células PP, secretoras do polipeptídio pancreático (MASHARANI; GERMAN, 2018). As células β são o tipo mais abundante em todos os animais, com variações entre espécies quanto ao perfil e a arquitetura da ilhota (STEINER et al., 2010). Por exemplo, são 77% das células em roedores, localizadas no centro da ilhota; e 55% em primatas, dispersas pela ilhota (CABRERA et al., 2006). Os outros tipos são menos abundantes: α (25%); δ (10%); ϵ (3%); e PP (5%) em humanos (MASHARANI; GERMAN, 2018). O perfil e a arquitetura também variam entre as cinco regiões anatômicas do pâncreas (CABRERA et al., 2006).

A função fisiológica das células β é a secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS). Aminoácidos e neurotransmissores também são secretagogos de insulina (FERRANNINI; MARI, 2020). A glicose sanguínea é captada pelas células β por transportadores de glicose (GLUT) 1 e 3 em humanos e 2 em roedores (MCCULLOCH et al., 2011) e prontamente convertida em glicose-6-fosfato pela enzima glicocinase (MATSCHEVSKY; ELLERMAN, 1968; RUTTER et al., 2015). Também chamada hexocinase IV, essa isoforma tem a maior constante de Michaelis dentre hexocinases (10 mM vs. 0,1 mM para hexocinase I) e torna a célula β o sensor da glicemia (RUTTER et al., 2015). Na célula β , o catabolismo da glicose aumenta rapidamente a razão $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ no

citoplasma, inibindo canais de potássio controlados por ATP. Isso causa a despolarização da membrana plasmática e, conseqüentemente, a abertura de canais de Ca^{2+} controlados por voltagem (VGCC) tipo-L e influxo de Ca^{2+} . Isso é seguido pela liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} de reservas intracelulares, principalmente o retículo endoplasmático (RE). Finalmente, o Ca^{2+} livre se liga a proteína sinaptotagmina, ativando o complexo SNARE. Isso promove a exocitose das vesículas de insulina e a conseqüente liberação do hormônio na circulação (HENQUIN, 2011; RUTTER et al., 2015; SEINO; SHIBASAKI; MINAMI, 2015). Sob estímulo da glicose, a secreção de insulina é bifásica. A primeira fase consiste num pulso secretório intenso e transiente (5-8 min) e a segunda fase consiste no aumento lento e progressivo da secreção enquanto durar o estímulo metabólico (FERRANNINI; MARI, 2020; SEINO; SHIBASAKI; MINAMI, 2015). São tecidos-alvo da insulina: hepatócitos, fibras musculares esqueléticas e adipócitos – coletivamente “tecidos periféricos”. Naqueles, a insulina promove a captação da glicose e a síntese de glicogênio, acetil-CoA, ácidos graxos e triacilgliceróis (NELSON; COX, 2013).

1.1 Diabetes *mellitus* – definição e epidemiologia

A Associação Americana de Diabetes (ADA) define o Diabetes *mellitus* (DM) como “um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultando de defeitos na secreção da insulina, ação da insulina, ou ambas”. Ele causa complicações como neuropatias, nefropatias, retinopatias e doenças cardiovasculares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010). Afeta 463 milhões de adultos (9,3% das pessoas com 20-79 anos de idade) e causa 4,2 milhões de mortes por ano (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). O DM tem três tipos principais: Diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1), Diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) e Diabetes *mellitus* gestacional (DMG), além de outros tipos específicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

O DM1 compreende 5-10% dos casos e é causado pela ablação autoimune das células β , resultado da combinação entre a predisposição genética e a exposição a fatores ambientais (ALSHIEKH et al., 2017; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010; PUGLIESE, 2015). O aparecimento de autoanticorpos para células das ilhotas (ICA) – também chamados autoanticorpos associados ao DM1 – indicam a autoimunidade e são o principal critério clínico para discriminar entre o diagnóstico de DM1 e DM2 (ATKINSON et al., 2020). As manifestações clínicas do DM1 são hiperglicemia, cetoacidose e perda rápida de peso. A destruição das células β geralmente é rápida e a secreção de insulina é depletada: a

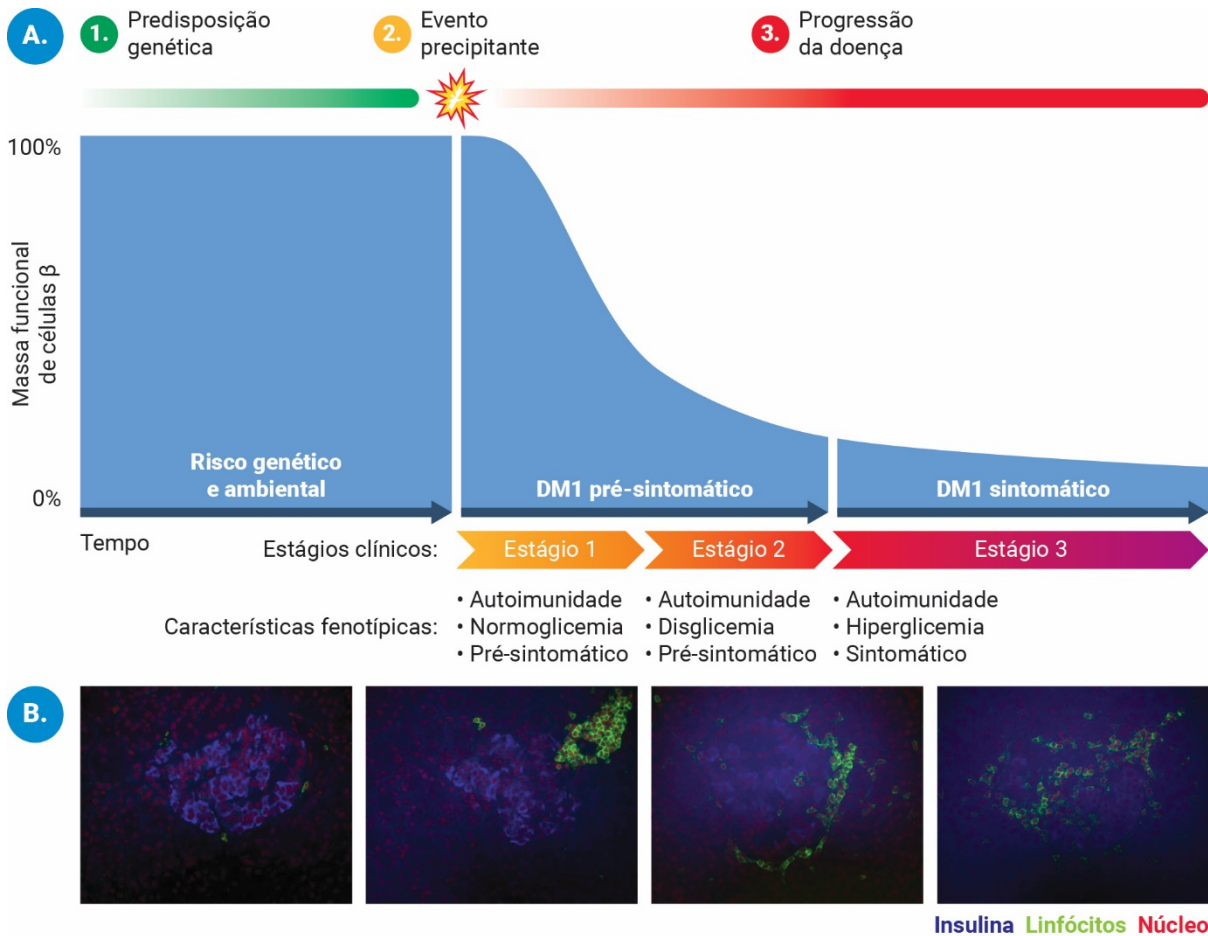
administração de insulina exógena é fundamental para a sobrevivência do indivíduo. Comumente tem início na infância/adolescência, mas pode começar em qualquer idade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Afeta 1,1 milhões de jovens (até 19 anos) no mundo, com 128,9 mil novos casos anualmente. Em 2019, o Brasil tinha a terceira maior incidência (7,3 mil casos/ano) e a terceira maior prevalência (51,5 mil) de crianças (até 14 anos) com DM1 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

O DM2 é o tipo mais comum (90-95% dos casos) e é causado pela resistência periférica à insulina e deficiência relativa na secreção de insulina. É associado à predisposição genética, obesidade e idade avançada, apesar do recente aumento na incidência entre jovens (KAHN; FERRIS; O'NEILL, 2020). O DMG é caracterizado por hiperglicemia durante a gestação e geralmente é naturalmente resolvido após o parto. Contudo, pessoas com DMG tem maior risco de desenvolver DM2 no futuro. Afetou 20,4 milhões de mães de partos nativos no mundo em 2019 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Outros tipos específicos são menos comuns (1,5-2% dos casos) e incluem a Diabetes monogênica: causada por mutação autossômica dominante hereditária num único gene (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

1.2 Diabetes *mellitus* do tipo 1 – história natural

O DM1 é uma doença de etiologia multifatorial e manifestação clínica heterogênea. A história natural do DM1 é dividida em três fases: (1) predisposição genética, (2) evento precipitante e (3) progressão da doença. O DM1 é iniciado pelo evento precipitante e subdividido em três estágios clínicos, definidos por características do indivíduo. No primeiro estágio, é detectada a autoimunidade (≥ 2 ICA), mas o indivíduo apresenta-se normoglicêmico e assintomático. No segundo estágio, é iniciada uma perturbação da glicemia (disglicemia), por uma diminuição da tolerância à glicose, mas o indivíduo ainda é assintomático. No terceiro estágio, são identificados a hiperglicemia evidente e os sintomas de DM (ALSHIEKH et al., 2017; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; INSEL et al., 2015). A Fig. 1A apresenta a história natural do DM1, atualizada a partir do modelo inicialmente proposto por Eisenbarth em 1986 (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; EISENBARTH, 1986; INSEL et al., 2015). A seguir, discutiremos os fenômenos importantes para o desenvolvimento do DM1 em sua sequência cronológica.

Figura 1 – História natural do Diabetes *mellitus* do tipo 1



(A) Modelo atualizado da história natural do DM1, originalmente proposto por Eisenbarth (1986). O gráfico indica a massa funcional de células β durante a vida do indivíduo que desenvolve DM1. A predisposição genética é o primeiro evento necessário para o desenvolvimento de DM1. O evento precipitante se manifesta como uma injúria às células β que ativa a autoimunidade e inicia a inflamação das ilhotas, denominada insulite (Fig. 2). A insulite causa a destruição das células β e o início da progressão clínica da doença. Esta última fase ainda é dividida em três estágios. No primeiro estágio, o indivíduo apresenta autoimunidade (detecção de ≥ 2 ICA), é normoglicêmico e assintomático. No segundo estágio, o indivíduo apresenta autoimunidade, disglicemia e é assintomático. No terceiro estágio, o indivíduo finalmente apresenta a hiperglicemia e os sintomas de DM. Fonte: ilustrado pelo autor, revisado de (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; INSEL et al., 2015).

(B) Micrografias de autopsias de pâncreas de pacientes com DM1 mostrando a insulite. É indicada, da direita para a esquerda, a progressão da lesão inflamatória. Notar o aumento gradual do recrutamento de linfócitos (verde), a invasão da ilhota pelo infiltrado e o desaparecimento progressivo das células β (azul). Insulina: azul, CD45: verde, TO-PRO: vermelho. Fonte: adaptado de (RICHARDSON; MORGAN; FOULIS, 2014).

1.2.1 Predisposição genética

O DM1 é poligênico: mais de 50 loci conferindo risco de desenvolver DM1 são conhecidos e muitos destes tem função imunológica (ATKINSON et al., 2020; KELLY et al., 2015). O risco de DM1 é 0,3% na população geral. Filhos de mãe ou pai afetados tem risco de 2% e 4,6%, respectivamente, e 10% quando ambos pais são afetados. O risco é 6% em irmãos

de indivíduos afetados. A concordância é 6% e 50-70% entre gêmeos dizigóticos e monozigóticos, respectivamente (ALSHIEKH et al., 2017; ATKINSON et al., 2020).

Variações dos genes do antígeno leucocitário humano (HLA) no cromossomo 6p21.31 explicam 40-50% da hereditariedade do DM1 (KELLY et al., 2015). Estes genes codificam o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T. Os genes *HLA-DQ* e *HLA-DR* conferem o maior risco de DM1. O gene insulina confere o segundo maior risco (KELLY et al., 2015). Assim como HLA, outros genes importantes de risco ao DM1 (*CTLA4*, *PTPN22*, *IL2RA*, *IHIF1*) também tem função imunológica (KELLY et al., 2015; PUGLIESE, 2015).

Os genes de risco causam defeitos na apresentação de antígenos, na indução da tolerância imunológica e na regulação da resposta imune. Por exemplo, moléculas diabetogênicas de HLA (alelos HLA de alto risco) podem ter menor afinidade a autoantígenos, comprometendo a seleção negativa de linfócitos T autoreativos no timo (tolerância central). Variações no gene insulina comprometem sua apresentação aos linfócitos T imaturos durante a seleção negativa (KELLY et al., 2015; PUGLIESE, 2015). *PTPN22*, *IL2RA*, *CTLA* e *IHIF1* causam disfunção em linfócitos T regulatórios e defeitos na indução da anergia, supressão ou deleção de linfócitos T autoreativos (tolerância periférica) (KELLY et al., 2015; PUGLIESE, 2015). Assim, tais defeitos permitem a sobrevivência da população de linfócitos T autoreativos imaturos no indivíduo com genótipo de risco (PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008; TOMITA, 2017).

1.2.2 *Evento precipitante*

ICA são o primeiro sinal clínico de autoimunidade e aparecem após alguns meses/anos de idade, indicando que um “evento precipitante” ou “gatilho ambiental”, cedo na vida, ativa a autoimunidade ‘dormente’ (ALSHIEKH et al., 2017; PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008). Os principais autoantígenos para ICA são insulina, glutamato descarboxilase 65, tirosina fosfatase IA2 e transportador de zinco 8 (ALSHIEKH et al., 2017). Entre indivíduos recém-diagnosticados, 98% apresentam pelo menos um ICA (PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008). No momento da soro-deteção, indivíduos com 1 ICA tem risco de 15% de desenvolver DM1 em até 10 anos; enquanto indivíduos com ≥ 2 ICA tem risco de 70% (ATKINSON et al., 2020). A concordância entre gêmeos monozigóticos no DM1 também indica que pressões ambientais, combinadas a predisposição genética, são importantes para o desenvolvimento da doença (ALSHIEKH et al., 2017). Isso ainda é reforçado pelo aumento de 2-5% na incidência

mundial de DM1 nas últimas décadas, indicando alteração da exposição da população à fatores ambientais (PUGLIESE, 2015)

Possíveis gatilhos são fatores na dieta, citotoxinas e infecções virais (STECK; REWERS, 2015; STENE; TUOMILEHTO, 2017). Destes, infecção por enterovírus são as mais estudadas (ATKINSON et al., 2020). Infecção enteroviral tem maior incidência em crianças pré-diagnosticadas e correlacionam temporalmente com a sazonalidade do aparecimento de ICA e da incidência de DM1 (PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008; PUGLIESE, 2015; STECK; REWERS, 2015). Além disso, alguns enterovírus tem tropismo por células β e são capazes de induzir DM1 em modelos animais (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009). Finalmente, a imunomarcagem de células β em autópsias para a proteína enteroviral VP1 é mais frequente em pacientes de DM1 e partículas do enterovírus Coxsackie B4 foram isoladas do pâncreas de um paciente (RICHARDSON; MORGAN; FOULIS, 2014). Infecções virais ou outros fatores podem causar injúrias às células β e o início do mecanismo histopatológico do DM1: a inflamação das ilhotas, denominada insulite (ALSHIEKH et al., 2017).

1.2.3 Insulite e progressão da doença

Eizirik et al. dividem a insulite em três etapas: (1) indução, (2) amplificação e (3) manutenção ou resolução (Fig. 2). A presença intracelular e extracelular de dsRNA viral ou de células danificadas ativa receptores de reconhecimento de padrões (PRR; principalmente TLR, RIG-I e MDA5) e os fatores de transcrição NF- κ B, STAT1 e IRF3 nas células β (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009). Estes fatores regulam várias respostas das células β à inflamação, discutidas abaixo, mas inicialmente acontece a liberação de IFN- α , IFN- β e quimiocinas, superexpressão de MHC I e morte induzida por dsRNA (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009; PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008; RICHARDSON; MORGAN; FOULIS, 2014). Tais respostas das células β promovem a invasão das ilhotas por células apresentadoras de antígenos (APC, como macrófagos e células dendríticas). APC provavelmente migram para o linfonodo pancreático, onde apresentam autoantígenos aos linfócitos autoreativos imaturos, causando a diferenciação de linfócitos T auxiliares (Th1) e células T citotóxicas (CTL), que serão recrutadas para as ilhotas pelas quimiocinas. Também acontece a ativação de linfócitos B, resultando em produção de ICA (ALSHIEKH et al., 2017; PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008). Tais eventos são a etapa de “indução” da insulite (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009).

Na ilhota, é estabelecido um “diálogo” molecular entre as células β e o infiltrado imune. Quimiocinas liberadas por células β induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias (principalmente IL-2, IFN- γ , IL-1 β , e TNF) por Th1 e APC. Estas citocinas, por sua vez, induzem o recrutamento de CTL e a liberação contínua de quimiocinas por células β , mediada por ativação de NF- κ B, STAT1 e IRF3. Este diálogo representa a etapa de “amplificação” da insulite (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009; PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008).

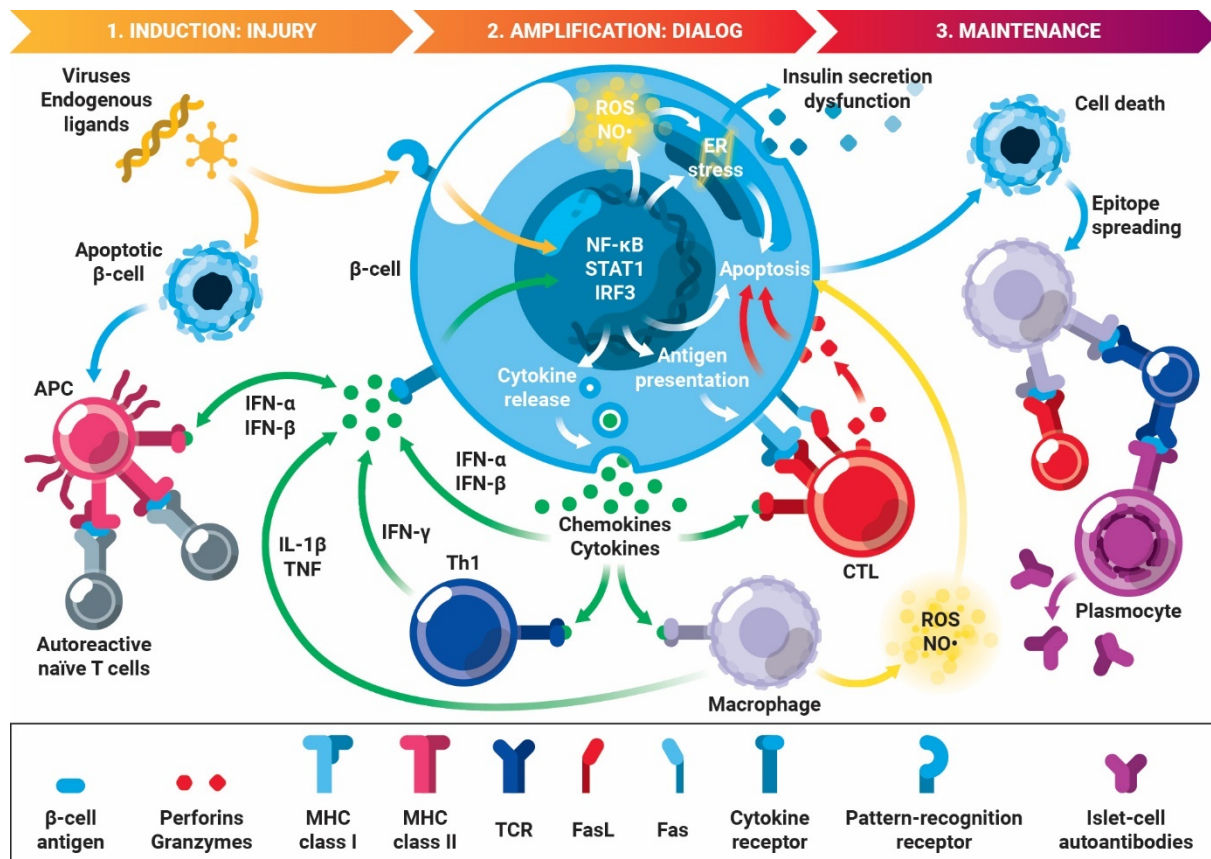
A ativação de NF- κ B, STAT1 e IRF3 em células β modula genes reguladores de várias respostas das células β à inflamação (Fig. 2). Por exemplo: apresentação de antígenos (superexpressão de MHC I); atração de leucócitos (indução de *CCL2*, *CXCL10*, *CCL20*, *IL-15* e *ICAM-1*); estresse nitrosativo e oxidativo (indução de *iNOS* e *SOD2*, inibição de glutathione peroxidases, glutathione redutases, peroxirredoxinas e catalases); estresse de RE (inibição de *SERCA2b*, chaperonas e *XBPIs*, indução de *CHOP* e *ATF3*); disfunção da GSI (inibição de *GLUT2*, *ISL1* e *PDX1*); e ativação de vias apoptóticas (inibição de *BCL-2* e *BCL-XL*, indução de *BAX*, *BAK* e *Fas*) (CARDOZO et al., 2001a, 2001b; CNOP et al., 2005; EIZIRIK et al., 2003; KUTLU et al., 2003; PIROT; EIZIRIK; CARDOZO, 2006; RASSCHAERT et al., 2003; SIGFRID et al., 2003).

A superexpressão de MHC I, aliada ao estresse de RE, causa a apresentação de antígenos modificados (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009) e a consequente amplificação da autoimunidade – fenômeno denominado “espalhamento de epítipo” (ALSHIEKH et al., 2017). Isso aumenta o reconhecimento de células β por CTL (RICHARDSON; MORGAN; FOULIS, 2014). O estresse de RE e a inibição de *PDX1* e *ISL1* comprometem a biossíntese de insulina (OSLOWSKI; URANO, 2011; PIROT et al., 2007). IL-1 β também promove a abolição da primeira fase de secreção de insulina (OHARA-IMAIZUMI et al., 2004). Tais fenômenos contribuem para o início da disglucemia (INSEL et al., 2015). Finalmente, o estresse nitro/oxidativo e o estresse de RE convergem para a morte de células β , principalmente por ativação da via intrínseca da apoptose e clivagem de procaspase 9 (CNOP et al., 2005; PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008; TOMITA, 2017). Paralelamente, a morte das células β pode ser mediada por liberação de espécies reativas por APC ou por interação com CTL. A morte dependente de CTL é mediada pela liberação de perforina e granzimas ou pela ligação das moléculas Fas em células β e FasL em CTL (PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008).

Em autópsias de pâncreas de doadores com DM1, a insulite afeta 33% das ilhotas insulina-positivas, mas apenas 2% das ilhotas insulina-negativas (CAMPBELL-THOMPSON et al., 2016). Isso representa a última etapa da insulite: a manutenção da inflamação em

ilhas com uma população residual de células β e a resolução da inflamação após a destruição completa deste tecido (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009). Finalmente, a hiperglicemia evidente e os sintomas do terceiro estágio clínico do DM1 se manifestam após a redução de 40-90% na massa de células β , com algum grau de regeneração de células β (ALSHIEKH et al., 2017; EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009).

Figura 2 – Mecanismos de destruição das células β na insulite



Mecanismos autoimunes e inflamatórios que causam a morte das células β na insulite. Acima são indicadas as fases da insulite como dividida por Eizirik et al.: (1) indução, (2) amplificação e (3) manutenção/resolução. A indução é causada por injúria contra células β . A apoptose de células β , liberação de IFN- α e IFN- β e a superexpressão de MHC I promovem o recrutamento e a ativação de APC e linfócitos T autoreativos. Na amplificação, estes leucócitos causam a morte de células β por quatro mecanismos: liberação de citocinas pró-inflamatórias; liberação de espécies reativas por macrófagos; liberação de perforina e granzimas por CTL; e ligação das moléculas Fas-FasL em células β e CTL, respectivamente. Na fase de manutenção, a apoptose e fagocitose das células β aumentam a apresentação de autoantígenos modificados aos linfócitos T e o espalhamento de epítopo, com manutenção da inflamação. Abaixo é indicada legenda dos receptores e ligantes envolvidos nas interações célula-célula. APC: *antigen presenting cell*; Th1: *T helper lymphocyte 1*; CTL: *Cytotoxic T lymphocyte*; ROS: *reactive oxygen species*. Fonte: ilustrado pelo autor, revisado de (EIZIRIK; COLLI, 2020; EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009; PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008).

1.3 Espécies reativas e estresse oxidativo

Radicais (ou radicais livres) são espécies químicas com elétrons não-pareados em orbitais atômicos ou moleculares externos. Espécies reativas (RS) de oxigênio (ROS) são

aquelas derivadas da redução de O_2 e são mais reativas que este (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Isso inclui radicais de oxigênio [como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila (OH^{\bullet})] e não-radicais [como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$)]. Também existem RS de nitrogênio, como óxido nítrico (NO^{\bullet}) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Radicais reagem avidamente entre si (por exemplo, $O_2^{\bullet-} + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^-$) e com biomoléculas em reações de adução (onde o produto também é um radical) e oxirredução (transferência de elétrons, prótons ou oxigênio), agindo como oxidantes ou redutores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Estas reações podem causar dano oxidativo ao atacar constituintes celulares, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. As reações intracelulares envolvendo radicais e RS podem ser autossustentáveis e propagar o dano oxidativo pela célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Contudo, RS também participam na sinalização intracelular e intercelular – fenômeno denominado sinalização redox. Esta funciona principalmente pela oxidação de resíduos de cisteína e íons de ferro em metaloproteínas por H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, NO^{\bullet} e $ONOO^-$, principalmente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Tais espécies modulam a ativação de cinases (como MAPK) e receptores de membrana para hormônios ou fatores de crescimento, inativação de fosfatases (como PTEN), expressão gênica (regulação da atividade de NF- κ B, AP-1, p53 e genes nucleares para proteínas mitocondriais), abertura de canais iônicos e indução de proteínas do choque térmico (BEDARD; KRAUSE, 2007; GÖRLACH et al., 2015; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A sinalização redox regula funções como fagocitose, inflamação, biossíntese de hormônios, crescimento e migração celular, senescência e apoptose. De importância, a produção de RS na sinalização redox deve ser próxima ao seu alvo intracelular de ação (BEDARD; KRAUSE, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; USHIO-FUKAI, 2006).

Existem muitas fontes intracelulares de RS, como a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ($O_2^{\bullet-}$); oxidação de metais de transição em metaloproteínas, como ferro, cobre e manganês ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ou OH^{\bullet}); e enzimas como óxido nítrico sintases (NO^{\bullet}), citocromo P450, xantina oxirredutases e NADPH oxidases ($O_2^{\bullet-}$ ou H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Paralelamente, vários agentes e enzimas antioxidantes são responsáveis pela neutralização de RS. Vitaminas, carotenoides e glutatona reduzida (GSH) são exemplos importantes de agentes antioxidantes. Já a defesa antioxidante enzimática inclui a inativação de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 por superóxido dismutases (SOD); e a inativação de H_2O_2 em H_2O por peroxirredoxinas, glutatona peroxidases (GPx) ou catalases. Peroxirredoxinas também

inativam ONOO^- em dióxido de nitrogênio (NO_2^-) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; LENZEN, 2008).

Assim, o balanço entre a produção intracelular de RS e a capacidade antioxidante celular é fundamental para, simultaneamente, permitir a sinalização redox e minimizar o dano oxidativo. O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de RS e a capacidade antioxidante, levando à interrupção da sinalização redox, à propagação descontrolada do dano oxidativo e à sobrecarga do reparo celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). As consequências do estresse oxidativo podem ser proliferação celular e síntese aumentada das defesas antioxidantes (respostas citoprotetoras), mas também podem incluir injúria, senescência e morte celular e consequente envelhecimento do tecido e do organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Células β tem capacidade antioxidante reduzida em relação a outros tecidos, principalmente quanto a neutralização de H_2O_2 (GRANKVIST; MARKLUND; TÄLJEDAL, 1981; LENZEN, 2008; TIEDGE et al., 1997). A expressão e atividade de catalase e GPx em células β é $\sim 10\%$ àquela em hepatócitos, enquanto em outros tecidos é $\sim 50\%$. A expressão e atividade de SOD não é significativamente diferente em células β em relação a outros tecidos (TIEDGE et al., 1997). Esse desbalanço entre a defesa contra $\text{O}_2^{\cdot-}$ e a defesa contra H_2O_2 favorece o acúmulo deste último (LENZEN, 2008). Isso torna células β particularmente vulneráveis ao dano molecular e o estresse oxidativo (LENZEN, 2008). Durante a insulite especialmente, acontece a liberação de H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot} , ONOO^- e OH^{\cdot} por macrófagos do infiltrado. Também acontece a geração intracelular de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e NO^{\cdot} induzida por citocinas nas próprias células β , levando à formação de ONOO^- , que é altamente citotóxico (RABINOVITCH; SUAREZ-PINZON, 1998; YOON; JUN, 2005). Estes fenômenos promovem dano oxidativo aos constituintes celulares durante a inflamação e induzem apoptose e necrose de células β (RABINOVITCH; SUAREZ-PINZON, 1998). Além disso, ilhotas tem capacidade reduzida de reparar o dano ao DNA causado por RS (MODAK; PARAB; GHASKADBI, 2009). Notavelmente, a disfunção e a morte de células β no DM2 também são mediadas pelo estresse oxidativo (KANETO et al., 2006; ROBERTSON et al., 2004; VILAS-BOAS et al., 2021a). Contudo, é importante mencionar que o perfil antioxidante das células β , favorecendo acúmulo de H_2O_2 , também pode representar o papel sinalizador desta RS, quando produzida em concentrações fisiológicas. De acordo, H_2O_2 tem papel sinalizador importante em células β e outros tecidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; PI et al., 2007).

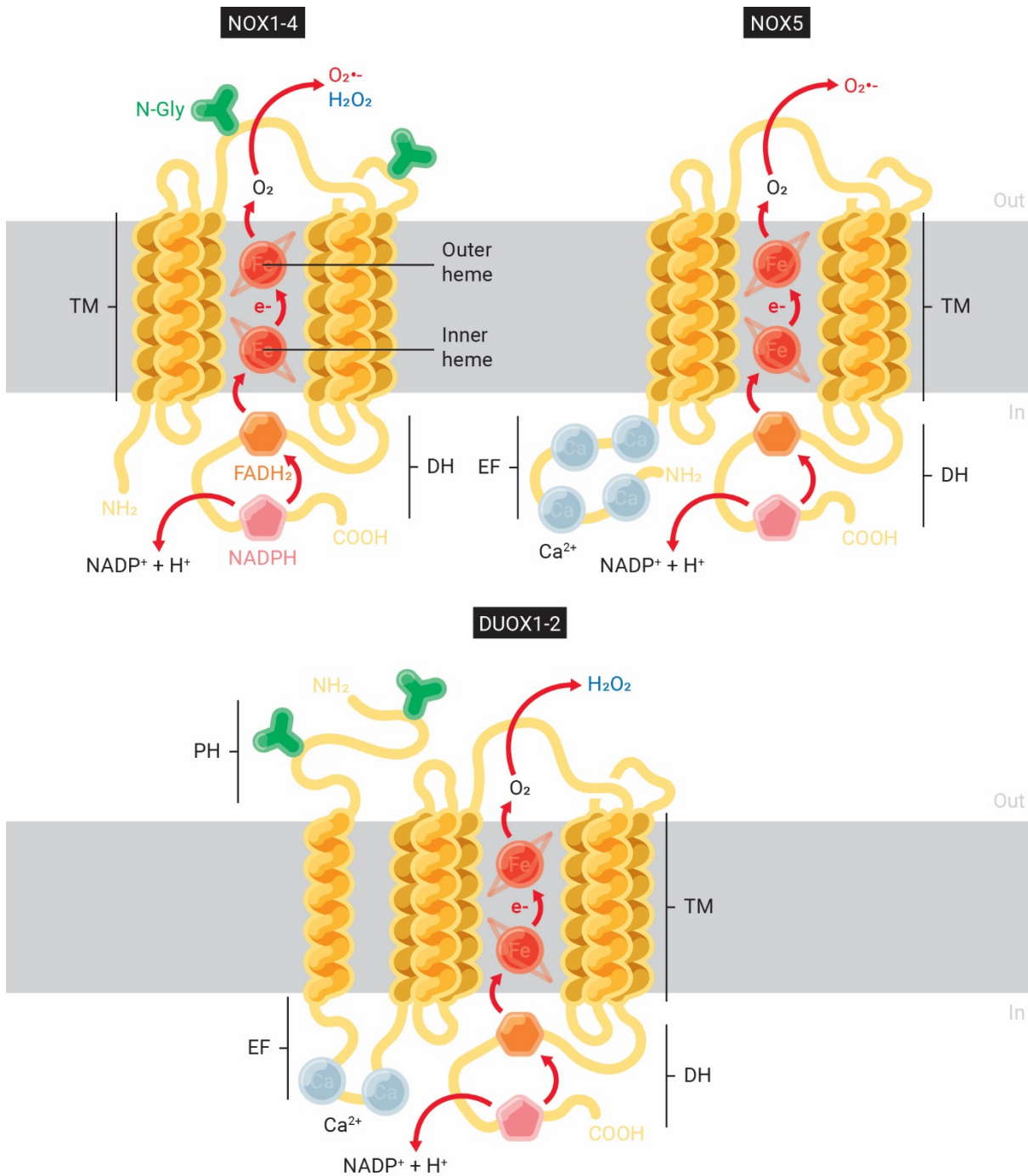
1.4 NADPH oxidases – estrutura, expressão e função

NADPH oxidases (NOX) são flavocitocromos que catalisam a reação $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^{\cdot-}$ (BUVELOT; JAQUET; KRAUSE, 2019; SUMIMOTO, 2008). Notavelmente, são as únicas enzimas onde a geração de ROS é considerada a sua função principal e não o subproduto de outra reação. O genoma dos mamíferos codifica sete genes homólogos da enzima: *NOX1*, *NOX2*, *NOX3*, *NOX4*, *NOX5*, *DUOX1* e *DUOX2*. Tais genes expressam as isoenzimas da família NOX (BEDARD; KRAUSE, 2007).

A família é estruturalmente dividida em três grupos: NOX1-4, NOX5 e DUOX1-2 (Fig. 3) (GEISZT, 2006; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). As enzimas NOX1-4 tem um domínio transmembranar (TM) na posição N-terminal e um domínio citosólico de desidrogenase (DH) na posição C-terminal (MAGNANI; MATTEVI, 2019; SUMIMOTO, 2008). Ambas extremidades N-terminal e C-terminal da cadeia polipeptídica são voltadas para o citosol. O domínio DH liga NAD(P)H (com maior seletividade para NADPH que para NADH) e FAD. O domínio TM tem seis α -hélices evolutivamente conservadas e coordenam dois grupos heme no seu interior: um voltado para o citosol e outro voltado para a face extracitoplasmática. Cada grupo é coordenado por um par de resíduos de histidina invariantes na terceira e na quinta hélice. (BEDARD; KRAUSE, 2007). Este domínio tem grande similaridade ao citocromo tipo b no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e de procariotos (SUMIMOTO, 2008). A partir da extremidade N-terminal, NOX5 tem quatro domínios EF-hand citosólicos para ligação de Ca^{2+} ; e os domínios TM e DH, homólogos à NOX1-4. Partindo do N-terminal, DUOX1-2 tem um domínio extracitoplasmático de homologia à peroxidase (daí o nome *dual oxidase*); uma α -hélice transmembranar adicional; dois domínios EF-hand citosólicos; e os domínios TM e DH, estes homólogos à NOX1-4. Em DUOX1-2, os resíduos de histidina invariantes estão na quarta e na sexta hélice (GEISZT, 2006; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005).

NOX transportam elétrons através de membranas celulares, do NADPH na face citosólica para O_2 na face extracitoplasmática (Fig. 3) (BEDARD; KRAUSE, 2007). O NADPH é oxidado em NADP^+ (liberando H^+ no citosol) e dois elétrons são transferidos sequencialmente para FAD, heme interno, heme externo e finalmente para oceptor final: duas moléculas de O_2 ligadas ao heme externo (MAGNANI; MATTEVI, 2019). As enzimas NOX1-3 e NOX5 geram $\text{O}_2^{\cdot-}$ e as enzimas NOX4 e DUOX1-2 geram H_2O_2 pela dismutação imediata do $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Fig. 4) (BEDARD; KRAUSE, 2007).

Figura 3 – Estrutura de NADPH oxidases



Representação estrutural e topológica de NADPH oxidases. As isoformas são divididas estruturalmente em três grupos: NOX1-4, NOX5 e DUOX1-2. NOX1, NOX2, NOX3 e NOX4 possuem um domínio N-terminal transmembranar (TM) e um domínio C-terminal de desidrogenase (DH) no citoplasma. O domínio TM tem seis α -hélices: as hélices III e V coordenam dois grupos heme (vermelho) por resíduos de histidina invariantes. O domínio DH possui regiões para ligação de FAD (laranja) e NADPH (rosa). NOX5 possui quatro domínios N-terminais EF-hand (EF) para ligação de Ca^{2+} (cinza) e os domínios TM e DH, homólogos à NOX1-4. DUOX1 e DUOX2 possuem um ectodomínio N-terminal de homologia à peroxidase (PH), dois domínios EF-hand e os domínios TM e DH, homólogos à NOX1-4. Em DUOX1 e DUOX2, as hélices IV e VI coordenam os grupos heme. Setas vermelhas indicam o transporte de elétrons do NADPH para O_2 . N-Gly: N-glicosilação (verde). Ilustrado pelo autor, revisado de (GEISZT, 2006; GRASBERGER; REFETTOFF, 2006; GROEMPING; RITTINGER, 2005; MAGNANI; MATTEVI, 2019).

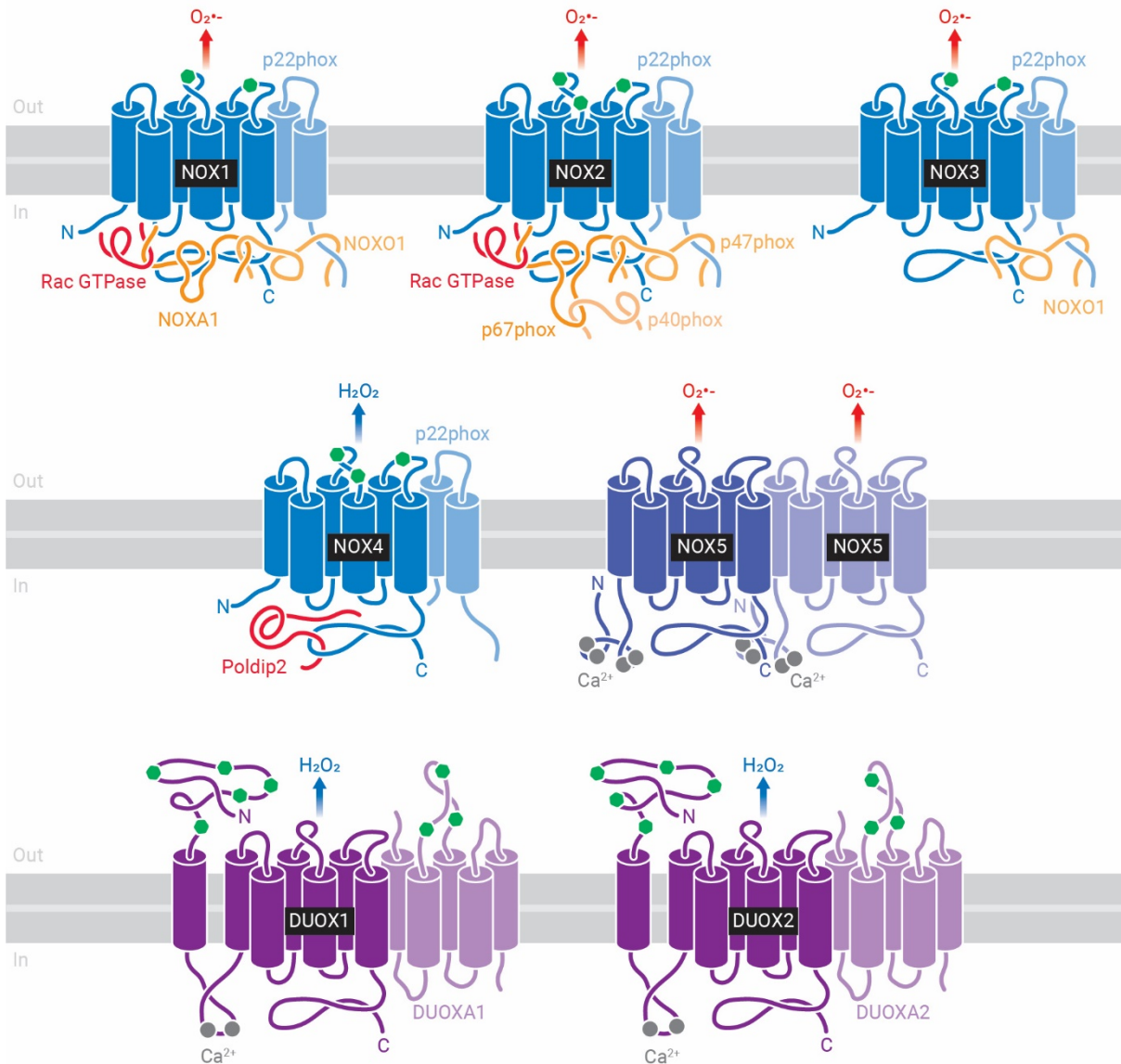
NOX interagem com outras proteínas: a subunidade estabilizadora p22^{phox}; as organizadoras p47^{phox} e NOXO1; as ativadoras p67^{phox} e NOXA1; a adaptadora p40^{phox}; os fatores de maturação DUOXA1 e DUOXA2 e Rac GTPase (Fig. 4). NOX1-4 são constitutivamente ligadas à subunidade estabilizadora transmembranar p22^{phox} num heterodímero. Essa ligação estabiliza ambas proteínas, enquanto os monômeros são degradados pelo proteossomo (BEDARD; KRAUSE, 2007).

A geração de ROS por NOX2 depende da ligação do dímero NOX2-p22^{phox} ao complexo ternário PHOX (formado por p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox}) e à Rac (BEDARD; KRAUSE, 2007). O complexo PHOX permanece livre no citoplasma até a fosforilação de p47^{phox}. Esta modificação permite a translocação do complexo até a membrana e a ligação NOX2-p22^{phox}-PHOX. p47^{phox} atua como organizadora: liga o complexo PHOX à p22^{phox}. p67^{phox} atua como ativadora: interage com NOX2 e com Rac e a interação p67^{phox}-Rac-NOX2 ativa a catálise. p40^{phox} atua como adaptadora: liga fosfatidilinositol na membrana, assim como p47^{phox} (SUMIMOTO; MINAKAMI; MIYANO, 2019; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005).

O dímero NOX1-p22^{phox} é constitutivamente ligado ao complexo NOXO1-NOXA1. NOXO1 é homóloga a p47^{phox} e NOXA1 é homóloga a p67^{phox} (SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). NOXA1 não interage com p40^{phox} e não são conhecidos homólogos de p40^{phox} (BEDARD; KRAUSE, 2007; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). NOXO1 independe de fosforilação para ligar p22^{phox}. Contudo, a ativação enzimática de NOX1 ainda depende da interação NOXA1-Rac-NOX1. Além disso, p47^{phox} e p67^{phox} também tem a capacidade de regular NOX1 (SUMIMOTO; MINAKAMI; MIYANO, 2019; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005).

NOX3 tem atividade enzimática constitutiva. Contudo, a catálise é intensificada pela ligação de NOXO1, p47^{phox} ou p67^{phox} (SUMIMOTO; MINAKAMI; MIYANO, 2019; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). NOX4 interage somente com p22^{phox} e também tem atividade constitutiva. NOX3 e NOX4 não interagem com Rac (BEDARD; KRAUSE, 2007).

Figura 4 – Família NOX de NADPH oxidases



As isoformas NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 e suas respectivas interações com outras subunidades são representadas. NOX1, NOX2, NOX3 e NOX4 são estabilizadas pela subunidade estrutural p22^{phox}; enquanto NOX5, DUOX1 e DUOX2 dispensam tal interação. NOX1 é ativada pela interação com o complexo NOXO1-NOXA1 e Rac. NOX2 é ativada pelo complexo PHOX (p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox}) e por Rac. NOX3 tem atividade constitutiva, mas a catálise é intensificada por NOXO1, e a isoforma dispensa outras subunidades. NOX4 também é constitutiva e não interage com subunidades regulatórias, apenas a polimerase poldip2. NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 não interagem com Rac. NOX5 forma oligômeros em membranas (representado aqui por um homodímero NOX5-NOX5). DUOX1 e DUOX2 estão associadas aos seus respectivos fatores de maturação DUOXA1 e DUOXA2. NOX5, DUOX1 e DUOX2 são ativadas por Ca²⁺. Círculos verdes indicam N-glicosilação. NOX1, NOX2, NOX3 e NOX5 geram O₂^{•-} e NOX4, DUOX1 e DUOX2 geram H₂O₂. Ilustrado pelo autor, revisado de (BEDARD; KRAUSE, 2007; BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014; GRASBERGER et al., 2007; GROEMPING; RITTINGER, 2005).

NOX5, DUOX1 e DUOX2 são moduladas por Ca²⁺ livre no citoplasma e não interagem com nenhuma subunidade regulatória (BEDARD; KRAUSE, 2007). NOX5 é ativada pela ligação de Ca²⁺ aos domínios EF-hand e forma oligômeros em membranas. Em

DUOX1-2, os domínios EF-hand tem atividade auto-inibitória: a ligação de Ca^{2+} alivia reversivelmente a inibição e permite a catálise (KAWAHARA et al., 2011; SUMIMOTO, 2008). Os fatores de maturação de DUOX (DUOXA) 1 e 2 são proteínas transmembranares do RE que auxiliam no processamento e N-glicosilação de DUOX1 e DUOX2, respectivamente (BEDARD; KRAUSE, 2007). DUOXA é necessária para a migração RE-Golgi-membrana plasmática de DUOX (GRASBERGER; REFETOFF, 2006). O processamento por DUOXA também promove a transição de DUOX do seu estágio imaturo gerador de $\text{O}_2^{\cdot-}$ para o seu estágio maturo gerador de H_2O_2 (AMEZIANE-EL-HASSANI et al., 2005; HOSTE et al., 2012).

A família NOX tem expressão tecidual e intracelular variada e sua função fisiológica depende do local de expressão (BEDARD; KRAUSE, 2007; GEISZT, 2006). NOX2 foi a primeira NADPH oxidase descrita. Originalmente denominada gp91^{phox} (*glycoprotein 91 kDa phagocyte oxidase*), é extensivamente N-glicosilada: a cadeia polipeptídica pesa 70-90 kDa na forma totalmente N-glicosilada e a remoção destas modificações cria uma cadeia com 55 kDa (BEDARD; KRAUSE, 2007). É expressa em fagócitos e é responsável pelo “surto respiratório”, evento onde o consumo de O_2 aumenta 10-20 vezes comparado ao ritmo basal (BEDARD; KRAUSE, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). NOX2 catalisa a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ para a destruição de microrganismos fagocitados. Defeitos genéticos da enzima causam a doença granulomatosa crônica. Indivíduos com essa doença sofrem com infecções piogênicas com reação granulomatosa e linfadenopatia (BEDARD; KRAUSE, 2007). Também é expressa em neurônios, músculo e endotélio. É localizada na membrana plasmática e membrana do fagossomo de fagócitos, citoesqueleto perinuclear de músculo liso e na membrana sináptica do hipocampo. De interesse, a expressão do gene *NOX2* é ativada pelos fatores NF- κ B, IRF1 e IRF2 e induzida por IFN- γ em macrófagos, granulócitos e fagócitos (BEDARD; KRAUSE, 2007; LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007).

NOX1 foi a primeira homóloga de NOX2 identificada (~60% de identidade de aminoácidos), justificando a atual nomenclatura das NADPH oxidases (BEDARD; KRAUSE, 2007). NOX1 tem massa molecular de 53 kDa e provavelmente tem dois estágios de N-glicosilação: 56 kDa e 60 kDa (MATSUMOTO et al., 2014). É expressa principalmente no epitélio do cólon e células vasculares. É localizada no RE e cavéolas do músculo liso vascular e no núcleo de queratinócitos (BEDARD; KRAUSE, 2007; GEISZT, 2006). Sua principal função possivelmente é a defesa da mucosa e a regulação da pressão arterial (BUVELOT; JAQUET; KRAUSE, 2019; GEISZT, 2006). O gene tem expressão constitutiva em muitos

tecidos, mas apresenta sequências responsivas a STAT, IRF e NF- κ B (BEDARD; KRAUSE, 2007).

NOX3 tem ~56% de identidade com NOX2 (BEDARD; KRAUSE, 2007). Tem massa de 50 ou 53 kDa e sofre N-glicosilação (NAKANO et al., 2007). Sua expressão é quase exclusiva ao epitélio sensorial e nervos do ouvido interno, onde é responsável pela biossíntese do otólito. Animais com mutação em NOX3 tem o fenótipo “*head tilt*”, caracterizado pela falta de equilíbrio e defeitos no vestibulo. Também tem expressão em tecidos fetais (baço e rim) e possível papel no desenvolvimento. Não existem estudos sobre a localização intracelular de NOX3 (BEDARD; KRAUSE, 2007; GEISZT, 2006).

NOX4 tem ~39% de identidade com NOX2. A imunomarcção de duas bandas com 65 kDa e 75-80 kDa sugere que NOX4 é N-glicosilada. Tem vasta expressão no rim e células vasculares. É localizada no RE do músculo liso e núcleo de células endoteliais (BEDARD; KRAUSE, 2007; GEISZT, 2006). Está envolvida na nefropatia diabética e pode ter papel como sensor do oxigênio renal (GEISZT, 2006). A localização nuclear de NOX1 e NOX4 em alguns tecidos pode ser de particular interesse, dado que o estado redox do núcleo influencia a afinidade de NF- κ B pelo DNA (BEDARD; KRAUSE, 2007; HUTTER; GREENE, 2000).

NOX5 tem 27% de identidade com NOX2, peso molecular de 85 kDa e provavelmente é a única isoforma não glicosilada (GEISZT, 2006; TOUYZ et al., 2019). É expressa principalmente em linfócitos B e T, espermatozoides e tecidos fetais (BEDARD; KRAUSE, 2007; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). É possível que tenha um papel regulatório em espermatozoides (GEISZT, 2006). Dada sua ausência no genoma de roedores, pouquíssimo é conhecido sobre sua expressão e função fisiológica (BUVELOT; JAQUET; KRAUSE, 2019).

DUOX1 e DUOX2 tem 47% de identidade com NOX2 e 83% de identidade entre si (GEISZT, 2006). DUOX1 e DUOX2 são N-glicosiladas no RE, gerando uma cadeia peptídica de 180 kDa. Essa glicosilação é modificada no Golgi, gerando uma cadeia de 190 kDa. Quando totalmente desglicosilada, tem peso molecular de 160 kDa (DE DEKEN et al., 2002). São expressas na membrana apical de células foliculares da tireoide, epitélio respiratório e gastrointestinal (BEDARD; KRAUSE, 2007; CARVALHO; DUPUY, 2017; MORAND et al., 2009). O H₂O₂ liberado por DUOX no coloide tireoidiano é necessário para a iodação da tireoglobulina por tireoperoxidase (CARVALHO; DUPUY, 2017). Em glândulas exócrinas e superfícies de mucosas, o H₂O₂ extracelular provavelmente é usado na conversão de tiocianato em hipotiocianita por lactoperoxidase, este com função microbicida (GEISZT et al., 2003). Mutações em DUOX2 levam ao hipotireoidismo. Não são conhecidos casos de

hipotireoidismo causados por mutações em DUOX1 e animais nocautes para DUOX1 não tem defeitos na síntese do hormônio tireoidiano. Isso pode indicar que as isoenzimas DUOX não tem função redundante na tireoide (BEDARD; KRAUSE, 2007; GEISZT, 2006). O H_2O_2 extracelular derivado de DUOX ainda é necessário para a formação da cutícula em *C. elegans* e do envelope de fertilização em ouriço-do-mar, a fim de evitar a polispermia (GEISZT, 2006).

Além dos animais, homólogos de NOX são encontrados em diversos eucariotos (BEDARD; LARDY; KRAUSE, 2007). O domínio taxonômico Eukaryota pode ser dividido em sete supergrupos: Excavata, Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Chromalveolata e Archaeplastida. Com exceção de Rhizaria, todos supergrupos tem homólogos de NOX (SUMIMOTO, 2008). Por exemplo: NOXA (não confundir com a subunidade regulatória de NOX1, NOXA1), NOXB, NOXC e redutase férrica (FRE) em fungos; e quelato de ferro redutase (FRO) e homóloga da oxidase do surto respiratório (RBOH) em plantas (BEDARD; LARDY; KRAUSE, 2007; SUMIMOTO, 2008). Evolutivamente, a família NOX pode ser dividida em NOX-ancestrais, NOX5-símile e DUOX (BEDARD; LARDY; KRAUSE, 2007). O surgimento de NOX-ancestrais precede a divergência entre plantas, metazoários e fungos. Estas enzimas receberam a capacidade de modulação por subunidades regulatórias (como FRE e NOX fúngicas e NOX1-3 metazoárias) ou permaneceram com atividade constitutiva (como NOX4). A adição de domínios EF-hand originou o grupo NOX5-símile, presente em plantas e animais. O ganho do domínio de homologia à peroxidase por NOX5-símile originou as enzimas DUOX exclusivamente em metazoários (BEDARD; LARDY; KRAUSE, 2007).

A perda de genes NOX aconteceu independentemente diversas vezes na evolução: roedores perderam NOX5, *C. elegans* perdeu NOX1-5 e apresenta somente DUOX, *P. falciparum* perderam todos genes NOX e plantas perderam genes NOX-ancestrais (NOX1-4) (BEDARD; LARDY; KRAUSE, 2007; SUMIMOTO, 2008).

Foi proposto que as NADPH oxidases evoluíram a partir da fusão das enzimas procariotas citocromo b_6 e flavodoxina, que teriam originado, respectivamente, os domínios TM e DH nas enzimas NOX, FRE e RBOH (SUMIMOTO, 2008). Curiosamente, considera-se que a fusão de flavodoxina e redutase ferredoxina-NADP⁺ originou enzimas como NOS e NADPH-citocromo P450 redutase (IYANAGI, 2005; SUMIMOTO, 2008). Inclusive, foi proposto que o surgimento da sinalização redox foi uma etapa importante para a evolução dos eucariotos (AGUIRRE et al., 2005) e que as enzimas NOX e a geração de ROS foram importantes para o surgimento da multicelularidade (BLACKSTONE, 2000; LALUCQUE;

SILAR, 2003). Contudo, ainda há muito que é desconhecido sobre a expressão e a função fisiológica da família NOX (BUVELOT; JAQUET; KRAUSE, 2019).

1.5 Família NOX em células β

Células β de roedores e de humanos expressam NOX1, NOX2, NOX4 e todas suas respectivas subunidades estabilizadoras/regulatórias (p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, NOXO1 e NOXA1), além de Rac GTPase (OLIVEIRA et al., 2003; REBELATO et al., 2012; UCHIZONO et al., 2006; WEAVER; TAYLOR-FISHWICK, 2015). Foi mostrada ainda a ausência de NOX3 em ilhotas de roedores (UCHIZONO et al., 2006). Células β humanas expressam também NOX5 (ANVARI et al., 2015; LI et al., 2012). A expressão de DUOX1 e DUOX2 em células β ainda não foi reportada na literatura. NOX2 e NOX4 tem marcação citoplasmática e perinuclear nesse tecido (WANG et al., 2018). Contudo, a localização intracelular mais específica destas e outras enzimas e subunidades NOX em células β permanece desconhecida.

ROS derivadas de NOX são necessárias para a GSIS (NEWSHOLME et al., 2009). Alta concentração de glicose induz a produção de H₂O₂ e o aumento da expressão de p47^{phox}. A exposição de células β a H₂O₂ estimula a secreção de insulina mesmo na ausência do estímulo de glicose (MORGAN et al., 2007; PI et al., 2007). Além disso, a inibição de NOX com difenileneiodônio (DPI, inibidor de flavoenzimas) ou silenciamento de p47^{phox} inibe a secreção estimulada por glicose ou por despolarização da membrana (IMOTO et al., 2008; MORGAN et al., 2009). Em contrapartida, a família NOX também pode ser mediadora da disfunção e apoptose da célula β dependentes de citocinas (TAYLOR-FISHWICK, 2013). A inibição de NOX2 com apocinina ou de NOX1 com ML171 preveniu a disfunção da GSIS, a indução de CXCL10 e a clivagem de procaspase 3 dependentes de citocinas (MICHALSKA et al., 2010; WEAVER; GRZESIK; TAYLOR-FISHWICK, 2015). Estudos anteriores do nosso grupo identificaram que a exposição de ilhotas de camundongos a IL-1 β , IFN- γ e TNF induz a produção de O₂⁻ após 2 h e de H₂O₂ após 4 h de exposição (VILAS-BOAS et al., 2021b). Esse efeito é eliminado pela inibição farmacológica ou deleção gênica de NOX2, mas não de NOX1. Além disso, o nocaute de *Nox2*, mas não de *Nox1*, previne a inibição da secreção de insulina induzida por citocinas e melhora a tolerância a glicose; indicando a participação de NOX2 na disfunção de células β induzida por inflamação (VILAS-BOAS et al., 2021b).

A exposição de linhagem celular ou ilhotas isoladas a IL-1 β , IFN- γ e TNF por 4 h ou 24 h induziu a expressão de *Nox1*, sem efeito significativo em outras isoformas (WEAVER; TAYLOR-FISHWICK, 2013). Alternativamente, outro trabalho mostrou a indução de p47^{phox} (organizadora de NOX2) em linhagem celular exposta a estas citocinas por 24 h (MORGAN et al., 2007). Contudo, o mesmo trabalho mostrou que, em ilhotas isoladas de rato, IL-1 β induz a expressão de p47^{phox} após 1 h de exposição, mas inibe a expressão de p47^{phox} após 24 h de exposição. Esta discrepância na literatura pode sugerir que a modulação da expressão da família NOX e suas subunidades regulatórias por citocinas pode variar segundo a isoforma ou subunidade investigada, o tempo de exposição ao desafio e o modelo estudado.

1.6 Justificativa e objetivos

A família NOX de NADPH oxidases tem considerável diversidade quanto a sua distribuição tecidual e intracelular, modo de regulação, atividade enzimática (geração de O₂⁻ ou H₂O₂), função fisiológica e participação em patologias (BEDARD; KRAUSE, 2007). Muito da função biológica da família NOX ainda permanece desconhecido (BUVELOT; JAQUET; KRAUSE, 2019), especialmente em células β (WEAVER; TAYLOR-FISHWICK, 2015). Existem evidências da importância de NOX para a fisiologia e patologia deste tecido (NEWSHOLME et al., 2009; TAYLOR-FISHWICK, 2013). Portanto, a proposta deste trabalho foi caracterizar a expressão da família NOX em células β . Esta proposta foi dividida em três partes.

Primeiro, identificar todas as isoformas expressas. A expressão de NOX1, NOX2, NOX4 e a ausência de NOX3 já foram documentadas (WEAVER; TAYLOR-FISHWICK, 2015). A expressão de NOX5 em células β humanas também já foi identificada (ANVARI et al., 2015; LI et al., 2012). Portanto, neste trabalho investigamos a presença das isoformas DUOX1 e DUOX2, além dos fatores de maturação DUOXA1 e DUOXA2, nesse tipo celular. A expressão de DUOX pode ser de particular importância. Dado a ausência de NOX5 em roedores, estas são as únicas isoformas moduladas por Ca²⁺ (BEDARD; KRAUSE, 2007), que é importante para a homeostasia do RE, biossíntese da insulina e GSIS (RUTTER et al., 2015). Além disso, identificar todas as isoformas expressas por células β é importante para inferir a função de ROS em diferentes vias de sinalização. Parece improvável que, mesmo em tecidos que expressam mais de uma isoforma, isoenzimas NOX tenham função redundante. NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 e NOX5, por exemplo, são todas expressas na vasculatura, desempenhando funções distintas (LASSÈGUE; GRIENDLING, 2010). DUOX1 e DUOX2

também não são redundantes na tireoide, como evidenciado por mutações em humanos e estudos genéticos em roedores (BEDARD; KRAUSE, 2007; BUVELOT; JAQUET; KRAUSE, 2019).

Segundo, caracterizar como citocinas presentes na insulite durante o desenvolvimento do DM1 modulam a expressão das isoformas NOX. Os trabalhos de Weaver et al. e Morgan et al. permitem imaginar que tal regulação seja dependente da isoforma ou subunidade, do tempo de exposição ao desafio e do modelo estudado (MORGAN et al., 2009; WEAVER; TAYLOR-FISHWICK, 2013). Assim, nossa segunda proposta foi documentar como a exposição de células β a IL-1 β , IFN- γ e TNF – condições que levam a morte das células β (EIZIRIK; MANDRUP-POULSEN, 2001) – influencia a expressão das isoformas NOX e suas subunidades. Isso pode indicar qual o papel de cada isoforma na disfunção e na morte de células β mediadas por citocinas. Isso também auxilia na possível identificação de quais isoformas são os melhores alvos terapêuticos para o DM1.

Terceiro, caracterizar a localização intracelular de cada isoforma. A sinalização redox exige a produção de ROS próxima aos alvos de regulação, a fim de garantir a especificidade da sinalização e minimizar o dano oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; USHIO-FUKAI, 2006). Por exemplo, a destruição de patógenos por fagócitos exige a localização de NOX2 na membrana plasmática e do fagossomo (BEDARD; KRAUSE, 2007). A localização de NOX2 no lamelipódio de células endoteliais regula a formação de complexos de adesão e a direção da migração (USHIO-FUKAI, 2006). Ainda no endotélio, a localização de NOX4 no RE regula a resposta a EGF por inibição de PTP1B (CHEN et al., 2008). Em plantas, a localização intracelular de RBOH regula a captação de Ca²⁺ e direciona o crescimento de pelos da raiz e do tubo polínico (CAROL et al., 2005; FOREMAN et al., 2003; LIU et al., 2009). Isso ilustra que a sinalização redox depende da localização intracelular de NOX (LAURINDO; ARAUJO; ABRAHÃO, 2014). Infelizmente, não podemos deduzir a localização intracelular de NOX em células β a partir de outros tipos celulares: a localização intracelular de algumas isoformas é tecido-específica (BEDARD; KRAUSE, 2007; USHIO-FUKAI, 2006). Assim, mapear a localização intracelular das isoformas NOX em células β pode possibilitar inferir suas respectivas funções.

Em resumo, defendemos que a caracterização da expressão da família NOX em células β pode avançar nosso entendimento da função fisiológica de NOX neste tecido, da participação de NOX na insulite e dos mecanismos patológicos do DM1.

1.6.1 Objetivos específicos

1. Identificar se as enzimas DUOX1 e DUOX2 e seus respectivos fatores de maturação DUOXA1 e DUOXA2 são expressos em células β . A expressão dos genes foi analisada por RT-qPCR em ilhota e linhagens de células β de rato. A expressão das proteínas foi estudada por imunoblotting.
2. Caracterizar a modulação da expressão de NOX em células β por citocinas pró-inflamatórias. Linhagem de células β foram expostas à uma combinação de citocinas por diferentes períodos. A expressão dos transcritos e proteínas NOX foi investigada por RT-qPCR e imunoblotting, respectivamente.
3. Descrever a localização intracelular das diferentes isoformas NOX em células β . Linhagens de células β foram imunomarcadas para diferentes isoenzimas e estruturas intracelulares para identificar a sublocalização.

5 CONCLUSÃO

A expressão de DUOX1, DUOX2 e *Duoxa2* em células β e a sua distribuição no RE sugere uma possível regulação, por essas isoformas, do transporte intracelular de Ca^{2+} , da homeostasia do RE e da sinalização da UPR. Por outro lado, a colocalização de NOX2 com insulina indica o envolvimento dessa isoforma na regulação direta da maquinaria de secreção. Em conjunto, isso aponta para funções isoforma-específicas de NOX na fisiopatologia de células β . Finalmente, a indução de genes *Nox* por citocinas sugere seu papel na resposta à inflamação e a sua posição a montante de vias executoras de estresse e morte celular.

5.1 Perspectivas futuras

Outros estudos serão necessários para descrever a função isoforma-específica de NOX em células β . Quanto a expressão e função de DUOX(A), é necessário identificar a sublocalização das isoformas, empregando marcadores específicos para o RE, e investigar a presença e sublocalização do dímero DUOX-DUOX1. Estudos funcionais – empregando deleção e resgate dos genes – podem descrever a função biológica de DUOX(A) no tecido. A quantificação e imageamento intracelular de Ca^{2+} e ROS sob estímulo de glicose ou sob indução da UPR podem ser empregados para investigar o papel dessas proteínas na homeostasia e estresse do RE. É importante mencionar, contudo, que sondas para ROS devem ser empregadas com cautela para estudar a função isoforma-específica de NOX: algumas isoformas geram a mesma RS ($\text{O}_2^{\cdot-}$ por NOX1 e NOX2 e H_2O_2 por NOX4 e DUOX) e algumas sondas tem limitações de sensibilidade e especificidade (BRANDES; REZENDE; SCHRÖDER, 2018; KALYANARAMAN et al., 2012). Quanto a colocalização de NOX2 com insulina, é possível caracterizar o estado redox da maquinaria de secreção sob estímulo metabólico na presença e ausência dessa isoforma para determinar a sua função na GSIS. Finalmente, será preciso descrever o papel de NOX em vias de sinalização da inflamação em células β . É possível caracterizar como a presença e ausência de diferentes isoformas sob insulto pró-inflamatório influenciam a ativação dos marcadores distais de estresse. Tais estudos potencialmente resolveriam as funções – aparentemente distintas – das diferentes isoformas de NADPH oxidases na fisiologia e na patologia das células β .

BIBLIOGRAFIA¹

AGUIRRE, J. et al. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 111–118, 2005.

AHMARANI, L. et al. Whole-cell and nuclear NADPH oxidases levels and distribution in human endocardial endothelial, vascular smooth muscle, and vascular endothelial cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 71–79, jan. 2013.

ALSHIEKH, S. et al. Autoimmune Type 1 Diabetes. In: **Textbook of Diabetes**. 5. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2017. p. 143–153.

ALTENHÖFER, S. et al. The NOX toolbox: Validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 14, p. 2327–2343, jul. 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. SUPPL. 1, p. S62, jan. 2010.

AMEZIANE-EL-HASSANI, R. et al. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30046–30054, 26 ago. 2005.

AMEZIANE-EL-HASSANI, R.; SCHLUMBERGER, M.; DUPUY, C. NADPH oxidases: New actors in thyroid cancer? **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 8, p. 485–494, 1 ago. 2016.

ANVARI, E. et al. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. **Free Radical Research**, v. 49, n. 11, p. 1308–1318, 2 nov. 2015.

ATKINSON, M. A. et al. Type 1 Diabetes Mellitus. In: **Williams Textbook of Endocrinology**. 14. ed. Philadelphia: Elsevier, 2020. p. 1403–1437.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69–82, 2014.

BATTISTA, S. et al. A mutated p53 gene alters thyroid cell differentiation. **Oncogene**, v. 11, n. 10, p. 2029–2037, 1995.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, jan. 2007.

BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K. H. NOX family NADPH oxidases: Not just in

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

mammals. **Biochimie**, v. 89, n. 9, p. 1107–1112, set. 2007.

BELARBI, K. et al. NADPH oxidases in Parkinson's disease: A systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 13 nov. 2017.

BINDOKAS, V. P. et al. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9796–9801, 14 mar. 2003.

BJORGVINSDOTTIR, H.; ZHEN, L.; DINAUER, M. Cloning of Murine gp91/Ao1r cDNA and Functional Expression in a Human X-Linked Chronic Granulomatous Disease Cell Line. **Blood**, v. 87, n. 5, p. 2005–2010, 1 mar. 1996.

BLACKSTONE, N. W. Redox control and the evolution of multicellularity. **BioEssays**, v. 22, n. 10, p. 947–953, 2000.

BOCK, L. V. et al. Chemomechanical Regulation of SNARE Proteins Studied with Molecular Dynamics Simulations. **Biophysical Journal**, v. 99, n. 4, p. 1221, 8 ago. 2010.

BONNER-WEIR, S. Islets of Langerhans: Morphology and Postnatal Growth. In: **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 41–52.

BRANDES, R. P.; REZENDE, F.; SCHRÖDER, K. Redox Regulation Beyond ROS: Why ROS Should Not Be Measured as Often. **Circulation Research**, v. 123, n. 3, p. 326, 7 jul. 2018.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 76, p. 208–226, 1 nov. 2014.

BROZZI, F. et al. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. **Diabetologia**, v. 58, n. 10, p. 2307–2316, 24 out. 2015.

BUUL, J. D. VAN et al. Expression and Localization of NOX2 and NOX4 in Primary Human Endothelial Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 3–4, p. 308–317, mar. 2005.

BUVELOT, H.; JAQUET, V.; KRAUSE, K. H. Mammalian NADPH oxidases. In: **Methods in Molecular Biology**. 1. ed. New York: Springer, 2019. v. 1982p. 17–36.

CABRERA, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2334–2339, 14 fev. 2006.

CAMPBELL-THOMPSON, M. et al. Insulinitis and β -cell mass in the natural history of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 3, p. 719–731, 1 mar. 2016.

CARDOZO, A. K. et al. Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-

cells by high-density oligonucleotide arrays. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 909–20, maio 2001a.

CARDOZO, A. K. et al. A Comprehensive Analysis of Cytokine-induced and Nuclear Factor- κ B-dependent Genes in Primary Rat Pancreatic β -Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 48879–48886, 28 dez. 2001b.

CARDOZO, A. K. et al. IL-1 β and IFN- γ induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. **Diabetologia**, v. 46, n. 2, p. 255–266, 12 fev. 2003.

CARDOZO, A. K. et al. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca²⁺ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca²⁺, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 452–61, fev. 2005.

CAROL, R. J. et al. A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 1013–1016, 15 dez. 2005.

CARVALHO, D. P.; DUPUY, C. Thyroid hormone biosynthesis and release. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 458, p. 6–15, 15 dez. 2017.

CHEN, K. et al. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. **Journal of Cell Biology**, v. 181, n. 7, p. 1129–1139, 30 jun. 2008.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S97-107, dez. 2005.

CNOP, M. et al. Selective Inhibition of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Dephosphorylation Potentiates Fatty Acid-induced Endoplasmic Reticulum Stress and Causes Pancreatic beta-Cell Dysfunction and Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 6, p. 3989–3997, 30 nov. 2006.

COE, H.; MICHALAK, M. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. **General Physiology and Biophysics**, v. 28, p. F96–F103, 1 jan. 2009.

DE DEKEN, X. et al. Cloning of Two Human Thyroid cDNAs Encoding New Members of the NADPH Oxidase Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 23227–23233, 28 jul. 2000.

DE DEKEN, X. et al. Characterization of ThOX Proteins as Components of the Thyroid H₂O₂-Generating System. **Experimental Cell Research**, v. 273, n. 2, p. 187–196, 15 fev. 2002.

DEMINE, S. et al. Pro-inflammatory cytokines induce cell death, inflammatory responses, and endoplasmic reticulum stress in human iPSC-derived beta cells. **Stem cell research & therapy**, v. 11, n. 1, p. 7, 3 jan. 2020.

DENG, Q.; HARVIE, E. A.; HUTTENLOCHER, A. Distinct signalling mechanisms mediate neutrophil attraction to bacterial infection and tissue injury. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 517–528, abr. 2012.

DI MARZO, N.; CHISCI, E.; GIOVANNONI, R. The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. **Cells**, v. 7, n. 10, p. 156, 4 out. 2018.

DIEBOLD, B. A. et al. Guidelines for the detection of NADPH oxidases by immunoblot and RT-qPCR. In: **Methods in Molecular Biology**. 1. ed. New York: Springer, 2019. v. 1982p. 191–229.

EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 21, p. 1360–1368, 22 maio 1986.

EIZIRIK, D. L. et al. Use of microarray analysis to unveil transcription factor and gene networks contributing to Beta cell dysfunction and apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1005, p. 55–74, nov. 2003.

EIZIRIK, D. L.; CARDOZO, A. K.; CNOP, M. The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 1, p. 42–61, fev. 2008.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L. Revisiting the role of inflammation in the loss of pancreatic β -cells in T1DM. **Nature Reviews Endocrinology** 2020 16:11, v. 16, n. 11, p. 611–612, 28 ago. 2020.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 219–226, abr. 2009.

EIZIRIK, D. L.; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death - The signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia**, v. 44, n. 12, p. 2115–2133, 1 dez. 2001.

EIZIRIK, D. L.; MIANI, M.; CARDOZO, A. K. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. **Diabetologia**, v. 56, n. 2, p. 234–41, fev. 2013.

FERRANNINI, E.; MARI, A. Physiology of Insulin Secretion. In: **Williams Textbook of Endocrinology**. 14. ed. Philadelphia: Elsevier, 2020. p. 1338–1348.

FEVER RAY. **Triangle Walks**. London, Reino Unido Rabid Records, , 2009.

FOREMAN, J. et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v. 422, n. 6930, p. 442–446, 27 mar. 2003.

FUSCO, A. et al. One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. **Molecular and cellular biology**, v. 7, n. 9, p. 3365–70, set. 1987.

GEISZT, M. et al. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 11, p. 1502–1504, ago. 2003.

GEISZT, M. NADPH oxidases: New kids on the block. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 289–299, 15 jul. 2006.

GINIATULLIN, A. R. et al. SNAP25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, n. 6, p. 1789–1797, 1 set. 2006.

GÖRLACH, A. et al. Calcium and ROS: A mutual interplay. **Redox Biology**, v. 6, p. 260–271, 1 dez. 2015.

GÖRLACH, A.; KLAPPA, P.; KIETZMANN, T. The endoplasmic reticulum: Folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1391–1418, 20 set. 2006.

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S. L.; TÄLJEDAL, I. B. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. **The Biochemical journal**, v. 199, n. 2, p. 393–8, 1 nov. 1981.

GRASBERGER, H. et al. Missense mutations of dual oxidase 2 (DUOX2) implicated in congenital hypothyroidism have impaired trafficking in cells reconstituted with DUOX2 maturation factor. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 6, p. 1408–1421, jun. 2007.

GRASBERGER, H.; REFETOFF, S. Identification of the maturation factor for dual oxidase: Evolution of an eukaryotic operon equivalent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18269–18272, 7 jul. 2006.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: A structural perspective. **The Biochemical journal**, v. 386, n. 3, p. 401–416, 15 mar. 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HENQUIN, J. C. Cell biology of insulin secretion. In: **Joslin's Diabetes Mellitus: Fourteenth Edition**. 14. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 83–107.

HILENSKI, L. L. et al. Distinct Subcellular Localizations of Nox1 and Nox4 in Vascular Smooth Muscle Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 4, p. 677–683, abr. 2004.

HOSTE, C. et al. The type of DUOX-dependent ROS production is dictated by defined sequences in DUOXA. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 18, p. 2353–2364, 1 nov. 2012.

HULL, R. L.; KAHN, S. E. Pancreatic morphology in normal and diabetic states. In: DEFRONZO, R. A. et al. (Eds.). **International Textbook of Diabetes Mellitus**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. p. 69–81.

HUTTER, D.; GREENE, J. J. Influence of the cellular redox state on NF- κ B-regulated gene expression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 183, n. 1, p. 45–52, abr. 2000.

IMOTO, H. et al. Impaired insulin secretion by diphenyleneiodium associated with perturbation of cytosolic Ca²⁺ dynamics in pancreatic β -cells. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5391–5400, nov. 2008.

INSEL, R. A. et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: A scientific statement of jdrf, the endocrine society, and the American diabetes association. **Diabetes Care**, v. 38, n. 10, p. 1964–1974, 1 out. 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 9. ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2019.

IVARSSON, R. et al. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2132–42, jul. 2005.

IYANAGI, T. Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 520–528, 9 dez. 2005.

JANISZEWSKI, M. et al. Regulation of NAD(P)H Oxidase by Associated Protein Disulfide Isomerase in Vascular Smooth Muscle Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40813–40819, 9 dez. 2005.

JANJIC, D. et al. Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 6, p. 639–648, 15 mar. 1999.

KAHN, C. R.; FERRIS, H. A.; O'NEILL, B. T. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. In: **Williams Textbook of Endocrinology**. 14. ed. Philadelphia: Elsevier, 2020. p. 1349–1370.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 1, p. 1, 1 jan. 2012.

KANETO, H. et al. Involvement of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 0, n. 0, p. 061221112325003, 21 dez. 2006.

KAWAHARA, T. et al. Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain. **Biochemistry**, v. 50, n. 12, p. 2013–2025, 29 mar. 2011.

KELLY, M. A. et al. Molecular genetics of type 1 diabetes. In: DEFRONZO, R. A. et al. (Eds.). **International Textbook of Diabetes Mellitus**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. p. 454–468.

KOSINOVÁ, L. et al. Unstable expression of commonly used reference genes in rat pancreatic islets early after isolation affects results of gene expression studies. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2016.

KRAUSE, K.-H. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 57, n. 5, p. S28-9, out. 2004.

KUTLU, B. et al. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2701–19, nov. 2003.

LALUCQUE, H.; SILAR, P. NADPH oxidase: An enzyme for multicellularity? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 9–12, 1 jan. 2003.

LAMBETH, J. D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 3, p. 319–331, 1 ago. 2007.

LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K. K. NADPH oxidases: Functions and pathologies in the vasculature. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 4, p. 653–661, abr. 2010.

LAURINDO, F. R. M.; ARAUJO, T. L. S.; ABRAHÃO, T. B. Nox NADPH Oxidases and the Endoplasmic Reticulum. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 17, p. 2755–2775, 10 jun. 2014.

LENZEN, S. Oxidative stress: The vulnerable β -cell. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 3, p. 343–347, 1 jun. 2008.

LI, N. et al. NADPH oxidase NOX2 defines a new antagonistic role for reactive oxygen species and cAMP/PKA in the regulation of insulin secretion. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2842–2850, nov. 2012.

LIU, P. et al. Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. **The Plant Journal**, v. 60, n. 2, p. 303–313, out. 2009.

LORTZ, S.; LENZEN, S.; MEHMETI, I. Impact of scavenging hydrogen peroxide in the endoplasmic reticulum for β cell function. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 55, n. 1, p. 21–29, 1 ago. 2015.

LUXEN, S. et al. Heterodimerization controls localization of Duox-DuoxA NADPH oxidases in airway cells. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 8, p. 1238–1247, 15 abr. 2009.

MAECHLER, P.; JORNOT, L.; WOLLHEIM, C. B. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 39, p. 27905–27913, 24 set. 1999.

MAGNANI, F.; MATTEVI, A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 59, p. 91–97, 30 dez. 2019.

MARROQUI, L. et al. Interferon- α mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 60, n. 4, p. 656–667, 1 abr. 2017.

MASHARANI, U.; GERMAN, M. S. Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. In: **Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology**. 10. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2018. p. 595–682.

MATSCHINSKY, F. M.; ELLERMAN, J. E. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 10, p. 2730–2736, 25 maio 1968.

MATSUMOTO, M. et al. Characterization of N-glycosylation sites on the extracellular domain of NOX1/NADPH oxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 196–204, 1 mar. 2014.

MCCLLENAGHAN, N. H. et al. Molecular characterization of the glucose-sensing mechanism in the clonal insulin-secreting BRIN-BD11 cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 2, p. 262–266, 14 jan. 1998.

MCCULLOCH, L. J. et al. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 104, n. 4, p. 648–653, 1 dez. 2011.

MEHMETI, I. et al. Peroxiredoxin 4 improves insulin biosynthesis and glucose-induced insulin secretion in insulin-secreting INS-1E cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 39, p. 26904–26913, 26 set. 2014.

MERGLÉN, A. et al. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 667–678, fev. 2004.

MESCHER, A. Endocrine Glands. In: **Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas**. 13. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2013. p. 413–438.

MEYEROVICH, K. et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 57, n. 1, p. R1–R17, 1 jul. 2016.

MICHALSKA, M. et al. Effects of pharmacological inhibition of NADPH oxidase or iNOS on pro-inflammatory cytokine, palmitic acid or H₂O₂-induced mouse islet or clonal

pancreatic β -cell dysfunction. **Bioscience Reports**, v. 30, n. 6, p. 445–453, 1 dez. 2010.

MODAK, M. A.; PARAB, P. B.; GHASKADBI, S. S. Pancreatic Islets Are Very Poor in Rectifying Oxidative DNA Damage. **Pancreas**, v. 38, n. 1, p. 23–29, jan. 2009.

MORAND, S. et al. Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 4, p. 1205–1218, abr. 2009.

MOREIRA, S. et al. Prioritization of Competing Damage and Developmental Signals by Migrating Macrophages in the Drosophila Embryo. **Current Biology**, v. 20, n. 5, p. 464–470, 9 mar. 2010.

MORGAN, D. 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**, v. 50, n. 2, p. 359–369, 5 jan. 2007.

MORGAN, D. et al. Association of NAD(P)H Oxidase with Glucose-Induced Insulin Secretion by Pancreatic β -Cells. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2197–2201, maio 2009.

NAKANO, Y. et al. Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. **Biochemical Journal**, v. 403, n. 1, p. 97–108, 1 abr. 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Hormonal Regulation and Integration of Mammalian Metabolism. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: W. H. Freeman, 2013. p. 929–978.

NEWSHOLME, P. et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. **Diabetologia**, v. 52, n. 12, p. 2489–2498, 7 dez. 2009.

NIETHAMMER, P. et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 996–999, 18 jun. 2009.

OHARA-IMAIZUMI, M. et al. The cytokine interleukin-1 β reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic β -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 41271–41274, 1 out. 2004.

OLIVEIRA, H. R. et al. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p. 1457–63, jun. 2003.

OLIVEIRA, H. R.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 2 Pt 1, p. C507-10, fev. 1999.

ORTIS, F. et al. Cytokine-Induced Proapoptotic Gene Expression in Insulin-Producing Cells Is Related to Rapid, Sustained, and Nonoscillatory Nuclear Factor- κ B Activation. **Molecular**

Endocrinology, v. 20, n. 8, p. 1867–1879, ago. 2006.

ORTIS, F. et al. Induction of nuclear factor- κ B and its downstream genes by TNF- α and IL-1 β has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1213–1225, 8 jul. 2008.

OSLOWSKI, C. M.; URANO, F. The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed β cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 207–215, abr. 2011.

PARK, H. S. et al. Cutting Edge: Direct Interaction of TLR4 with NAD(P)H Oxidase 4 Isozyme Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Production of Reactive Oxygen Species and Activation of NF- κ B. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 6, p. 3589–3593, 15 set. 2004.

PI, J. et al. Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1783–1791, 1 jul. 2007.

PIROT, P. et al. Transcriptional Regulation of the Endoplasmic Reticulum Stress Gene Chop in Pancreatic Insulin-Producing Cells. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1069–1077, 1 abr. 2007.

PIROT, P.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 156–165, mar. 2008.

PIROT, P.; EIZIRIK, D. L.; CARDOZO, A. K. Interferon- γ potentiates endoplasmic reticulum stress-induced death by reducing pancreatic beta cell defence mechanisms. **Diabetologia**, v. 49, n. 6, p. 1229–1236, 8 jun. 2006.

PUGLIESE, A. Immunopathogenesis of type 1 diabetes in Western society. In: DEFRONZO, R. A. et al. (Eds.). **International Textbook of Diabetes Mellitus**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. p. 442–453.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. **Biochemical pharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1139–49, 15 abr. 1998.

RADONIĆ, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 4, p. 856–862, 23 jan. 2004.

RASSCHAERT, J. et al. Global profiling of double stranded RNA- and IFN- γ -induced genes in rat pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 46, n. 12, p. 1641–1657, 1 dez. 2003.

RAZZELL, W. et al. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through duox activation and hydrogen peroxide release. **Current Biology**, v. 23, n. 5, p. 424–429, 4 mar. 2013.

REBELATO, E. et al. Expression of NADPH oxidase in human pancreatic islets. **Life Sciences**, v. 91, n. 7–8, p. 244–249, 17 set. 2012.

RELA, M.; REDDY, M. S. Pancreas. In: **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 41. ed. Philadelphia: Elsevier, 2015. p. 1179–1187.

RICHARDSON, S. J.; MORGAN, N. G.; FOULIS, A. K. Pancreatic pathology in type 1 diabetes mellitus. **Endocrine Pathology**, v. 25, n. 1, p. 80–92, 2014.

ROBERTSON, R. P. et al. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S119-24, fev. 2004.

ROGERS, T. B. et al. Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. **Bioscience reports**, v. 15, n. 5, p. 341–9, 1 out. 1995.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Digestive System III: Liver, Gallbladder, and Pancreas. In: **Histology: A Text and Atlas**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2015. p. 626–661.

RUTTER, G. A. et al. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. **Biochemical Journal**, v. 466, p. 203–218, 1 mar. 2015.

SANTOS, C. X. C. et al. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 10, p. 2409–2427, 2009.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–8, 2008.

SEINO, S.; SHIBASAKI, T.; MINAMI, K. β -Cell biology of insulin secretion. In: DEFRONZO, R. A. et al. (Eds.). **International Textbook of Diabetes Mellitus**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. p. 96–107.

SIGFRID, L. A. et al. Cytokines and nitric oxide inhibit the enzyme activity of catalase but not its protein or mRNA expression in insulin-producing cells. **Journal of molecular endocrinology**, v. 31, n. 3, p. 509–18, dez. 2003.

STECK, A. K.; REWERS, M. J. Epidemiology and risk factors for type 1 diabetes mellitus. In: DEFRONZO, R. A. et al. (Eds.). **International Textbook of Diabetes Mellitus**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. p. 17–28.

STEINER, D. J. et al. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. **Islets**, v. 2, n. 3, p. 135–45, 2010.

STENE, L. C.; TUOMILEHTO, J. Epidemiology of Type 1 Diabetes. In: **Textbook of**

Diabetes. 5. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2017. p. 29–42.

SUMIMOTO, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. **FEBS Journal**, v. 275, n. 13, p. 3249–3277, jul. 2008.

SUMIMOTO, H.; MINAKAMI, R.; MIYANO, K. Soluble Regulatory Proteins for Activation of NOX Family NADPH Oxidases. In: KNAUS, U. G.; LETO, T. L. (Eds.). **Methods in Molecular Biology**. 1. ed. New York: Springer, 2019. v. 1982p. 121–138.

SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 677–686, 9 dez. 2005.

SVINGEN, T. et al. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. **PeerJ**, v. 3, p. e855, 2015.

TANAKA, Y. et al. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic β cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12363–12368, 17 set. 2002.

TAVERNE, Y. J. H. J. et al. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 15, 2013.

TAYLOR-FISHWICK, D. A. NOX, NOX who is there? The contribution of NADPH oxidase one to beta cell dysfunction. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. APR, p. 40, 2013.

TIEDGE, M. et al. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1733–42, nov. 1997.

TOMITA, T. Apoptosis of pancreatic β -cells in Type 1 diabetes. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 183–193, 20 ago. 2017.

TOUYZ, R. M. et al. NOX5: Molecular biology and pathophysiology. **Experimental Physiology**, v. 104, n. 5, p. 605–616, 18 maio 2019.

TSUBOUCHI, H. et al. Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic β -cell line, MIN6—a role of NAD(P)H oxidase in β -cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 1, p. 60–65, 7 dez. 2004.

UCHIDA, K. et al. Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 119–126, 1 jan. 2011.

UCHIZONO, Y. et al. Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. **Life Sciences**, v. 80, n. 2, p. 133–139, 14 dez. 2006.

USHIO-FUKAI, M. Localizing NADPH Oxidase–Derived ROS. **Science's STKE**, v. 2006, n. 349, 2006.

VILAS-BOAS, E. A. et al. Transient NADPH oxidase 2-dependent H₂O₂ production drives early palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic islets. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 162, p. 1–13, 1 jan. 2021a.

VILAS-BOAS, E. A. et al. Early Cytokine-Induced Transient NOX2 Activity Is ER Stress-Dependent and Impacts β -Cell Function and Survival. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1305, 18 ago. 2021b.

VILAS-BOAS, E. A. et al. Lipotoxicity and β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Oxidative Stress Linked to NADPH Oxidase and ER Stress. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3328, 26 nov. 2021c.

WANG, X. et al. The novel NADPH oxidase 4 selective inhibitor GLX7013114 counteracts human islet cell death in vitro. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0204271, 28 set. 2018.

WEAVER, J. R. et al. Integration of pro-inflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 358, n. 1, p. 88–95, 6 jul. 2012.

WEAVER, J. R.; GRZESIK, W.; TAYLOR-FISHWICK, D. A. Inhibition of NADPH oxidase-1 preserves beta cell function. **Diabetologia**, v. 58, n. 1, p. 113–121, 3 jan. 2015.

WEAVER, J. R.; TAYLOR-FISHWICK, D. A. Regulation of NOX-1 expression in beta cells: A positive feedback loop involving the Src-kinase signaling pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 369, n. 1–2, p. 35–41, 30 abr. 2013.

WEAVER, J. R.; TAYLOR-FISHWICK, D. A. Role of NADPH oxidase in β cell dysfunction. In: **Islets of Langerhans, Second Edition**. 2. ed. Stockholm: Springer, 2015. p. 923–954.

WELDEMARIAM, M. M.; WOO, J.; ZHANG, Q. Pancreatic INS-1 β -Cell Response to Thapsigargin and Rotenone: A Comparative Proteomics Analysis Uncovers Key Pathways of β -Cell Dysfunction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 1080–1094, 20 jun. 2022.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278–286, 23 mar. 2008.

YOON, J. W.; JUN, H. S. Autoimmune destruction of pancreatic β cells. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, n. 6, p. 580–591, nov. 2005.

YU, Y. et al. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 3230, 10 dez. 2014.

ZIMA, A. V.; BLATTER, L. A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 310–321, 15 jul. 2006.