ELOISA APARECIDA VILAS BOAS

PAPEL DA NADPH OXIDASE DURANTE A INSULITE E A LIPOTOXICIDADE: ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO E MORTE DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS

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 Doutora em Ciências.

ELOISA APARECIDA VILAS BOAS

PAPEL DA NADPH OXIDASE DURANTE A INSULITE E A LIPOTOXICIDADE: ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO E MORTE DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS

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 Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ortis

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação

São Paulo 2020

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)

Vilas Boas, Eloisa Aparecida
Papel da NADPH oxidase durante a insulite e a
lipotoxicidade: estresse oxidativo, disfunção e
morte de células beta pancreáticas / Eloisa
Aparecida Vilas Boas; orientador Angelo Rafael
Carpinelli; coorientadora Fernanda Ortis. -- São
Paulo, 2020.

171 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. diabetes tipo 1. 2. diabetes tipo 2. 3. insulite. 4. lipotoxicidade. 5. NADPH oxidase. I. Carpinelli, Angelo Rafael, orientador. II. Ortis, Fernanda, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Eloisa Aparecida Vilas Boas		
Título da Tese:	Papel da NADPH oxidase durante a insulite e a lipotoxicidade: estresse oxidativo, disfunção e morte de células beta pancreáticas.		
Orientador:	Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli		
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado , em sessão publica realizada a, considerou o(a) candidato(a):			
()	Aprovado(a) () Reprovado(a)		
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:		
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:		
Examinador(a):	Assinatura:		
Presidente:	Assinatura:		

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Envolvimento de isoformas da NADPH oxidase na disfunção de células secretoras de insulina expostas a citocinas pró-inflamatórias", registrado sob o protocolo nº 62/2016, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em 07/07/2016 pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de 4 ano(s) a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Angelo Rafael Carpinelli
- Departamento: Fisiologia e Biofisica
- Membros da Equipe: Eloisa Aparecida Vilas Boas (Pós-graduando)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "Involvement of NADPH oxidase isoforms in the disfunction of insuling secreting cells exposed to proinflammatory cytokines", protocol nº 62/2016, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for Scientific Research Purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 7/7/2016 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Angelo Rafael Carpinelli
- Team members: Eloisa Aparecida Vilas Boas (Graduate Student).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule no 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Wistor	Macho/male	60-90 dias/days	144
	0 1	0 ,	

São Paulo, 20 de julho de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.181.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº 62/2016/CEUA, de 07/07/2016, relativo ao projeto intitulado "Envolvimento de isoformas da NADPH oxidase na disfunção de células secretoras de insulina expostas a citocinas pró-inflamatórias", de responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, aprovo as seguintes inclusões e conforme detalhamento da solicitação:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus musculus	C57BL/6	Macho	60-90 dias	96
Mus musculus	C57BL/6 (KO Nox-1)	Macho	60-90 dias	48
Mus musculus	C57BL/6 (KO Nox-2)	Macho	60-90 dias	48

- Os animais serão mantidos em ambiente com temperatura em torno de 23°C e sob ciclo de iluminação de 12/12 horas. Os animais serão anestesiados com cetamina e xilazina e posteriormente decapitados. O delineamento experimental completo está descrito na solicitação datada de 25/07/2017.

São Paulo, 27 de setembro de 2017

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.2.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **66/2015/CEUA**, válido até **27/07/2019**, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Fernanda Ortis**, do Departamento de **Biologia Celular e do Desenvolvimento**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Eloísa Aparecida Villas Boas** na equipe do Projeto de Pesquisa "Estudo da ativação diferencial de NF-kB em células beta pancreáticas e dos mecanismos que podem ser modulados para a prevenção de seu caráter pró-apoptótico", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita** Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Luciane Valeria Sita

Aos meus pais, José e Josefa, por todo amor e apoio.

Ao Joel, meu amor, por estar ao meu lado e me incentivar sempre.

Ao meu irmão, Eduardo, minha inspiração para estudar insulina.

Amo vocês imensamente!

AGRADECIMENTOS

Durante todos os anos do meu doutorado, tive a imensa sorte de ter contato com pessoas incríveis, que me ensinaram e me ajudaram muito. Que bom que tenho esta oportunidade de agradecimento.

Queria agradecer muito aos meus queridos orientadores. Ao Professor Angelo Carpinelli, foi um prazer imenso estar com o senhor por todos esses anos. Obrigada por ter acreditado em mim, por ter me aceitado e depois me aceitado de volta. Obrigada por todas as conversas, por todos os conselhos, por me possibilitar crescer e alçar voos. Aprendi muito com o senhor. Obrigada principalmente por ser uma pessoa muito humana. À Professora Fernanda Ortis, obrigada por todas as conversas científicas e não-científicas e pelos conselhos. Obrigada pela orientação, pelas correções de textos e pelos ensaios de apresentações. Fê, obrigada por me incentivar e por se importar tanto nos momentos mais difíceis. Um agradecimento especial à Professora Letícia Roma, que me aceitou no seu grupo na Alemanha para o meu doutorado-sanduíche e fez muito mais do que uma orientadora. Me deu todo o suporte dentro e fora do laboratório e me recebeu de portas abertas, não só como uma aluna de intercâmbio, mas como um membro de seu grupo. Lê, obrigada pela orientação de perto, pelo cuidado com a discussão dos resultados, pela amizade, cumplicidade e incentivo. Nunca serei grata o suficiente por vocês três, por todo apoio que me deram. Eu aprendi muito mesmo. Que privilégio enorme eu tive com vocês! Obrigada!

Um agradecimento mais do que especial aos meus amados pais. Obrigada mãe, por ser meu exemplo de mulher batalhadora, amorosa, dedicada, honesta e humana. Eu tento não decepcionar você e te dar orgulho, mãe. Obrigada por torcer por mim. Me inspiro muito em você. Obrigada pai, pelo enorme amor e apoio, mesmo eu tendo seguido caminhos distintos daqueles que você imaginou pra mim. Você é um exemplo de dedicação pra mim. Que sorte enorme eu tenho de ter vocês dois, obrigada por absolutamente tudo! Obrigada ao meu maninho amado, Eduardo, minha inspiração para estudar diabetes e uma pessoa muito doce. Amo vocês imensamente. Sinto muito pelos momentos em que não pude estar presente.

Queria agradecer ao meu marido, meu amor, meu parceiro, Joel, por toda a cumplicidade e amor. Obrigada por estar do meu lado, mesmo que distante pelas circunstâncias da carreira que ambos escolhemos. Obrigada por me apoiar em todas as minhas escolhas e por ser mais que um marido, um companheiro de jornada. Seguimos agora juntos para mais um novo desafio. Te amo, meu querido!

Lá do Rio Grande do Sul, queria agradecer aos meus queridos sogros Elio e Marinelva, que me apoiam e torcem por mim, mesmo de longe, e que me receberam desde sempre como uma filha. Às minhas cunhadas Keila e Marina, obrigada por mandarem sempre carinho e apoio.

Um agradecimento especial à Marlene Santos da Rocha, pela organização, paciência e por estar sempre disponível. Obrigada por todo suporte, Má. Já sinto uma saudade grande de você e do seu café! Queria agradecer aos meus colegas e amigos de laboratório. Do lab do Angelo: Ana (Aninha), Camila (Cá), Hilton, Jaqueline (Jack) e Maíra (hermana). Do lab da Fernanda: Adriane (Dri), Angelo (Angelito), Ariela, Carolina, Caroline, Catharina (Cat), Davidson (Davizinho), Gabriel e Viviane (Vivi). Do lab do Fernando: Amanda, Andressa, Carol e Daniel (Danielzinho). A jornada da pós-graduação é muito desafiadora, mas foi muito mais leve com a ajuda de vocês. Obrigada!

Gostaria de agradecer especialmente o Davizinho, o Angelito e a Vivi pela companhia sempre muito bem-vinda no 117 e também à Cat pela ajuda e paciência nos experimentos de imunohistoquímica. Sou também muito grata à ajuda inicial do Hilton e Daniel (Danielzinho) com o isolamento de ilhotas de camundongos, até que eu conseguisse fazer por conta própria.

Um agradecimento especial à Dra Carolina Parga, ao Sidney Veríssimo Filho e aos professores Luiz Roberto de Britto e Lucia Rossetti Lopes, por doarem os primeiros casais de animais NOX KO. Aos professores Fábio Siviero, Fernando Abdulkader, Maria Inês Borella, Maria Tereza Nunes e Sérgio Ferreira de Oliveira, obrigada por manterem seus laboratórios de portas abertas, fornecendo suporte adicional. Sou grata aos funcionários dos biotérios, em especial ao Bob, e aos funcionários da secretaria, pela assistência, em especial ao Zé Maria.

Agradeço à minha querida amiga Verona, que sempre me incentiva e me manda forças. Te amo, minha fofa! Patrícia (Paty maionese), graças à USP e às ilhotas, nos aproximamos e nos tornamos grandes amigas. Obrigada por ouvir meus áudios quilométricos e por compartilhar as alegrias e angústias da vida acadêmica. Gabriela (Gabi), obrigada por estar junto comigo e sempre me ouvir, obrigada pelo amor e também pela torcida, que são recíprocos. Agradeço à minha querida amiga, confidente e que sempre me lembra de que somos muito capazes, Camila, e aos meus queridos amigos do grupo do "Japa": Janaína (Jana, amiguinha), Maran, Marcelio, Mario, Sandra (corazón). Muito obrigada pelo suporte e pelo carinho, meus queridos! Ter o apoio de todos vocês foi muito importante.

Sou muito grata ao apoio financeiro das agências de fomento. O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo nº 142008/2016-8), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São

Paulo (FAPESP - processos nº 2013/08769-1; 2017/26339-5 e 2017/04580-2) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica).

I would also like to thank everyone from Leticia's group, in Germany. Andrea, Carine, Cécile, Christopher, Daniel, Janina, Léa, Magali, Natan, Noémie, Sandra, Tabea and Vanesa. It was a great pleasure to meet you all and to work with you. Thanks for being kind and supportive and for making me feel welcome. All of you have made a valuable contribution to my journey.

Special thanks to Nikolina for all the support during my stay in Germany and for always being a thoughtful and great friend.

Special thanks to professors Markus Hoth and Barbara Niemeyer for allowing the use of their labs and also for being extraordinary people, making such a great environment to work in. Many thanks to people from Hoth's Lab, especially Dr Dalia Alansary for the kindness and great advices. Thanks to Dr Monika Bozem for always being available for scientific discussions and for always being kind. Thanks to Regine Kaleja for always being available and helpful. Thanks to Prof Menger's group, especially Dr Emmanuel Ampofo, Lisa Nalbach and Caroline Bickelmann for their valuable collaboration with the islet sections and also for being nice people. I would also like to thank Prof Bruce Morgan for the significant scientific collaboration, and also for the friendly reception in Homburg, together with Prof Leticia Roma.

I'm very grateful to the financial support from the GradUS Global funding DAAD 2018 and from the EFSD Albert Renold Travel Fellowship Programme 2019.

Ich habe für Deutschland und die Leute die ich dort kennengelernt habe eine sehr große Zuneigung entwickelt. Ich schätze die wertvollen Erfahrungen die ich als Person und auch als Wiessenschaftlerin gesammelt habe. Deutschland fehlt mir sehr. Vielen Dank für alles!

"You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end each of us must work for his own improvement, and at the same time share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think we can be most useful."

Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar as pessoas. Para tal, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, partilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade, sendo o nosso dever particular ajudar aqueles a quem pensamos poder ser mais úteis.

Marie Curie

RESUMO

Vilas-Boas EA. Papel da NADPH oxidase durante a insulite e a lipotoxicidade: estresse oxidativo, disfunção e morte de células beta pancreáticas. 2020. 171 f. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

As duas principais formas de diabetes *mellitus* (DM) apresentam etiologias distintas, porém um desfecho clínico comum, a hiperglicemia. No DM1, uma inflamação específica e persistente nas ilhotas pancreáticas (insulite) leva à disfunção e perda massiva das células beta. No DM2, o alto consumo de nutrientes e o aumento da resistência à ação periférica da insulina levam ao aumento da demanda de insulina em um contexto de exposição prolongada das células beta a altas concentrações de glicose e ácidos graxos (glicolipotoxicidade), culminando com a disfunção e perda de células beta. Em ambos os casos de DM há, portanto, uma disfunção celular progressiva. As citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a insulite no DM1 e a glicolipoxicidade durante o DM2 contribuem para o desencadeamento do estresse de retículo endoplasmático (RE) e do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo. Dentre todas as fontes de EROs, as NADPH oxidases (NOX) são as únicas que aparentemente produzem EROs como função principal. As EROs derivadas da NOX são importantes sinalizadoras para a secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS), porém também podem levar à disfunção das células beta. Apesar de muitos esforços, ainda não somos capazes de distinguir entre a produção fisiológica e patológica de EROs. Algumas limitações têm sido a utilização de sensores redox pouco específicos, que não dizem com precisão o tipo de espécie produzida ou qual o compartimento de produção, além da utilização de inibidores sem especificidade à NOX ou às suas diferentes isoformas. Como essas espécies são rapidamente removidas pelo sistema antioxidante intracelular, elas devem ser relevantes, sobretudo, em locais próximos à sua produção. Levando isso em conta, utilizamos ilhotas de camundongos expostas a condições que mimetizam o DM1 (citocinas pró-inflamatórias) ou DM2 (ácido palmítico) e avaliamos: 1) a produção estática de superóxido; 2) a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tempo real e em diferentes compartimentos; 3) as variações em tempo real de NAD(P)H e 4) o envolvimento de isoformas da NOX na produção de H₂O₂, tolerância à glicose, secreção de insulina, viabilidade celular, homeostase de cálcio e ativação do estresse de RE. Com esses experimentos mostramos, pela primeira vez, a variação temporal da produção de EROs em células beta pancreáticas nessas condições. Nossos resultados indicam um aumento de superóxido entre 2 e 8 horas após exposição às citocinas e, com um sensor redox específico (roGFP2-Orp1) expresso exclusivamente na matriz mitocondrial ou no citosol/núcleo, mostramos que o citosol/núcleo apresenta papel principal na produção de H₂O₂ induzida por citocinas ou ácido palmítico, com pico entre 4 e 5 horas. Mostramos também a participação da mitocôndria na produção de H₂O₂ em ilhotas expostas ao ácido palmítico, porém sem relevância frente às citocinas. O pico de produção de H₂O₂ citosólico/nuclear coincide com uma diminuição de NAD(P)H intracelular e foi completamente eliminado em ilhotas NOX2 knockout (KO). Animais NOX2 KO apresentaram melhor tolerância à glicose e suas ilhotas foram protegidas da disfunção secretória e da morte induzida por citocinas ou ácido palmítico. Curiosamente, a ausência de NOX2 piorou a homeostase de cálcio total em ilhotas expostas às citocinas, mas foi mantida em ilhotas expostas ao ácido palmítico. As citocinas e o ácido palmítico levaram à depleção do cálcio de RE, com consequente aumento no mecanismo de entrada de cálcio operada por estoque (SOCE). Em ilhotas expostas às citocinas, não observamos envolvimento claro da NOX2 no SOCE. Por outro lado, ilhotas NOX2 KO tiveram um menor SOCE após a exposição ao ácido palmítico, quando comparadas às ilhotas WT, indicando que o H₂O₂ citosólico possa estar envolvido na regulação do SOCE e/ou níveis de cálcio de RE nessas condições. Ilhotas NOX1 KO, mas não ilhotas NOX2 KO, foram protegidas do estresse de RE induzido por citocinas, porém não observamos envolvimento de NOX no estresse de RE induzido por ácido palmítico. Por fim, avaliamos os efeitos *in vivo* da ausência de NOX no pâncreas e nas células beta, após indução de DM1 via injeções de doses baixas e múltiplas de estreptozotocina em animais NOX1 KO ou NOX2 KO. Ilhotas NOX2 KO de animais diabéticos foram protegidas de alguns parâmetros deletérios encontrados normalmente no desenvolvimento de diabetes, como a diminuição na circularidade e a diminuição da marcação de insulina. Porém, a perda de NOX1 parece prejudicar a proliferação celular nas ilhotas. Fica evidente a complexidade do papel da NOX tanto na funcionalidade, quanto na sobrevivência das células beta. Propomos que a inibição da NOX2 pode funcionar como uma terapia potencial contra a disfunção precoce de células beta induzida por citocinas pró-inflamatórias e ácidos graxos, no contexto do DM1 e do DM2.

Palavras-chave: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, células beta pancreáticas, insulite, lipotoxicidade, espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, ácido palmítico, NADPH oxidase, NOX2.

ABSTRACT

Vilas-Boas EA. Role of NADPH oxidase during insulitis and lipotoxicity: oxidative stress, dysfunction and death of pancreatic beta cells. 2020. 171 p. [thesis (PhD in Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

The two main types of diabetes *mellitus* (DM) have distinct etiologies, but a common clinical outcome, the hyperglycemia. In type 1 diabetes (T1D), a specific and persistent inflammation in the pancreatic islets (insulitis) leads to beta cells dysfunction and massive loss. In T2D, high consumption of nutrients and increased resistance to the peripheral action of insulin lead to increased demand for insulin in a context of prolonged exposure of beta cells to high concentrations of glucose and fatty acids (glucolipotoxicity), culminating in the dysfunction and loss of beta cells. In both types of DM, therefore, there is a progressive cellular dysfunction. The pro-inflammatory cytokines locally produced during insulitis in T1D and the glucolipotoxicity during T2D contribute to the triggering of the endoplasmic reticulum (ER) stress and the increase of reactive oxygen species (ROS) and the oxidative stress. Among all sources of ROS, the NADPH oxidases (NOX) are the only ones that apparently produce ROS as a main function. NOX-derived ROS are important signaling molecules for the glucosestimulated insulin secretion (GSIS), however they may also lead to the beta cells dysfunction. Despite many efforts, we are still unable to distinguish between the physiological and pathological ROS production. Some of the limitations include the use of nonspecific redox sensors, which do not accurately distinguish the type of species being produced or the compartment of production, in addition to the use of inhibitors without specificity to NOX or its different isoforms. As these species are rapidly removed by the intracellular antioxidant system, they should be relevant, especially in places close to their production. Taking this into account, we used mice islets exposed to conditions that mimic T1D (pro-inflammatory cytokines) or T2D (palmitic acid) and evaluated: 1) static production of superoxide; 2) realtime production of hydrogen peroxide (H₂O₂) in different compartments; 3) real-time assessment of NAD(P)H levels and 4) the involvement of NOX isoforms in H₂O₂ production, glucose tolerance, insulin secretion, cell viability, calcium homeostasis and activation of ER stress. With these experiments, we show, for the first time, the temporal variation of ROS production in pancreatic beta cells under these conditions. Our results indicate an increase of superoxide between 2 and 8 hours after exposure to the cytokines and, with a specific redox sensor (roGFP2-Orp1) exclusively expressed in the mitochondrial matrix or in the cytosol/nucleus, we show that the cytosol/nucleus plays a major role in the H₂O₂ production induced by cytokines or palmitic acid, peaking between 4 and 5 hours. We also show the participation of mitochondria in H₂O₂ production in islets exposed to palmitic acid, although with no relevance to cytokines. The cytosolic/nuclear peak of H₂O₂ coincides with a decrease of intracellular NAD(P)H and was completely eliminated in NOX2 knockout (KO) islets. NOX2 KO animals presented better glucose tolerance and their islets were protected against the secretory dysfunction and death induced by cytokines or palmitic acid. Interestingly, the absence of NOX2 worsened the total calcium homeostasis in islets exposed to the cytokines, but was maintained in islets exposed to palmitic acid. Cytokines and palmitic acid led to the depletion of ER calcium, with a consequent increase in the Store Operated Calcium Entry (SOCE) mechanism. In islets exposed to the cytokines, we did not observe a clear involvement of NOX2 in SOCE. On the other hand, NOX2 KO islets had lower SOCE after exposure to palmitic acid, when compared to WT islets, indicating that cytosolic H₂O₂ might be involved in the regulation of SOCE and/or ER calcium levels in these conditions. NOX1 KO, but not NOX2 KO, islets were protected from the ER stress induced by cytokines; however we did not observe involvement of NOX in the ER stress induced by palmitic acid. Finally, we evaluated the in vivo effects of NOX absence in the pancreas and beta cells, after T1D induction via injections of multiple low doses of streptozotocin in NOX1 KO or NOX2 KO animals. Islets from diabetic NOX2 KO were protected from some deleterious parameters normally found in the development of diabetes, such as decreased circularity and decreased insulin labeling. However, absence of NOX1 appears to impair cell proliferation in islets. The complexity of the role of NOX in beta cell functionality and survival is evident. We propose that NOX2 inhibition might be a potential therapy against early beta cells dysfunction induced by pro-inflammatory cytokines or fatty acids, in the context of T1D and T2D.

Keywords: type 1 diabetes, type 2 diabetes, pancreatic beta cells, insulitis, lipotoxicity, reactive oxygen species, oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, palmitic acid, NADPH oxidase, NOX2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes tipos celulares endócrinos em ilhotas de roedores e humanas 28
Figura 2 – Estrutura da molécula de insulina
Figura 3 – Vias intracelulares envolvidas na secreção de insulina estimulada por glicose
(GSIS) em células beta pancreáticas
Figura 4 – Interação entre as células beta das ilhotas pancreáticas e as células do sistema
imune durante a insulite e o desenvolvimento de DM1
Figura 5 – Vias intracelulares desencadeadas durante a insulite em células beta pancreáticas
39
Figura 6 - Vias envolvidas na glicolipotoxicidade durante o desenvolvimento do DM241
Figura 7 - Representação esquemática da Resposta da Proteína Mal Dobrada (UPR) e
ativação do estresse de retículo endoplasmático na célula beta pancreática44
Figura 8 - Diferentes eixos da UPR preferencialmente ativados em células beta pancreáticas
durante o desenvolvimento do DM1 e DM2
$\textbf{Figura 9} - \text{Fontes end\'ogenas de EROs, sistema de defesa antioxidante e efeitos biol\'ogicos}. \textbf{48}$
Figura 10 – Fontes de produção e remoção de EROs
Figura 11 – Esquema representativo de NOX1 a 5 e DUOX1 e 2
Figura 12 - Esquema representativo de NOX1 e NOX2, bem como as subunidades
necessárias para sua ativação
$\textbf{Figura 13} - \text{Mecanismo de detecção de H_2O_2 pelo sensor roGFP2-Orp1} \textbf{66}$
Figura 14 - Produção de superóxido em ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6J
expostas às citocinas pró-inflamatórias por diferentes períodos
Figura 15 – Ilhotas roGFP2-Orp1 e mito-roGFP2-Orp1
$\textbf{Figura 16} - \text{Variações em tempo real dos níveis de H_2O_2 citosólico/nuclear em ilhotas de} \\$
camundongos ro GFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 24 horas consecutivas $$
80
Figura 17 - Variações em tempo real dos níveis de NAD(P)H em ilhotas de camundongos
$roGFP2-Orp1\ expostas\ \grave{a}s\ citocinas\ pr\acute{o}-inflamat\'orias\ por\ 24\ horas\ consecutivas\81$
$\textbf{Figura} \ \ \textbf{18} \ - \ \text{Variações} \ \ \text{em} \ \ \text{tempo} \ \ \text{real} \ \ \text{dos} \ \ \text{n\'iveis} \ \ \text{de} \ \ H_2O_2 \ \ \text{mitocondrial} \ \ \text{em} \ \ \text{ilhotas} \ \ \text{de}$
camundongos mito-roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 24 horas
consecutivas
Figura 19 - Variações em tempo real dos níveis de NAD(P)H em ilhotas de camundongos
mito-roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 24 horas consecutivas83

Figura 20 - Produção de superóxido em ilhotas pancreáticas de camundongos WT, NOX1
KO ou NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias
Figura 21 - Produção H ₂ O ₂ citosólico/nuclear em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 e
NOX2 KO:roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 4h30 min
Figura 22 – Porcentagem de gordura corporal de animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO 88
Figura 23 – Teste de tolerância à glicose (GTT) de animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO90
Figura 24 – Teste de tolerância à insulina (ITT) de animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO 91
Figura 25 – Constante de decaimento de glicose (kITT) de animais WT, NOX1 KO e NOX2
KO92
Figura 26 – Secreção de insulina de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas às
citocinas pró-inflamatórias94
Figura 27 - Conteúdo intracelular de insulina de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO
expostas às citocinas pró-inflamatórias95
Figura 28 - Dinâmica de cálcio total de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas
às citocinas pró-inflamatórias
Figura 29 - Mecanismo de entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) de ilhotas de
camundongos WT e NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias100
Figura 30 - Expressão proteica de marcadores do estresse de retículo em ilhotas de
camundongos WT, NOX1 KO e NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias102
Figura 31 - Apoptose de células INS-1E após exposição às citocinas pró-inflamatórias na
ausência ou presença do antagonista da NOX1 e 4 (ML171)
Figura 32 - Viabilidade celular de ilhotas de camundongos WT, NOX1 KO e NOX2 KO
expostas às citocinas pró-inflamatórias
Figura 33 - Modulação de isoformas NOX e PDX-1 por citocinas pró-inflamatórias e pelo
silenciamento de NOX2
Figura 34 – Glicemia em jejum de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após
indução de DM1 por MLDZ114
Figura 35 – GTT de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após indução de DM1
por MLDZ
Figura 36 – Área de ilhotas de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após indução
de DM1 por MLDZ
Figura 37 – Circularidade de ilhotas de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após
indução de DM1 por MLDZ118

camundongos roGFP2-Orp1 e NOX2 KO:roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por	
horas consecutivas	3
Figura 45 – Produção H ₂ O ₂ citosólico/nuclear em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1	e
NOX2KO:roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por 5 horas	5
Figura 46 - Secreção de insulina de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas a	o
ácido palmítico13	
Figura 47 – Dinâmica de cálcio total de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO exposta	
ao ácido palmítico	
Figura 48 - Mecanismo de entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) de ilhotas d	e
camundongos WT e NOX2 KO expostas ao ácido palmítico	1
Figura 49 – Viabilidade celular de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas a	О
ácido palmítico	
-	
Figura 50 – Expressão proteica de marcadores do estresse de retículo em células BRIN-BD1	1
expostas ao ácido palmítico na ausência ou presença de inibidor da NOX14	5
Figura 51 – Mecanismo proposto para a indução de disfunção da célula beta no DM1 e DM	2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para análise da expressão proteica	69
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados na reação de RT-PCR em tempo real	72
Tabela 3 – Anticorpos utilizados para imunomarcação das ilhotas	74
Tabela 4 – Evolução do peso corporal (g) durante MLDZ	112
Tabela 5 – Monitoramento da glicemia (mg/dl) após MLDZ	112
Tabela 1A – Animais utilizados na genotipagem	163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA: acetil-coenzima A

AG: ácido graxo

ADA: Associação Americana de Diabetes

ANOVA: Análise de variância

ATF (4 ou 6): fator de ativação da transcrição

ATP: trifosfato de adenosina BSA: albumina sérica boyina

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHOP: proteína homóloga a C/EBP

CIPMM: Centro de Fisiologia Integrativa e Medicina Molecular

CO₂: gás carbônico

Covid-19: *corona virus disease 2019*

ClC3: canais para cloreto do tipo 3

CPT-I: carnitina-palmitoil transferase tipo I

DAG: diacilglicerol

DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

DHE: dihidroetidina

DM (1 ou 2): diabetes *mellitus* (tipo 1 ou tipo 2)

DNA: ácido desoxirribonucleico

DPI: difenileneiodônio

DTT: ditiotreitol

ECL: Enhanced Chimiluminescence

eIF2α: fator eucariótico de iniciação da tradução

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

ERAD: complexo de degradação associada ao retículo

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

FADH₂: dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido

FRET: Transferência Ressonante de Energia por Fluorescência

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GTT: teste de tolerância à glicose

GSIS: secreção de insulina estimulada por glicose

GPR: receptor de membrana acoplado à proteína G

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IFN-γ: interferon-gama

IL-1β: interleucina 1-beta

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IP₃: inositol-trifosfato

IRE1: enzima que requer inositol 1

ITT: teste de tolerância à insulina

JNK: c-Jun N-terminal quinase

KH: Krebs Henseleit

kITT: constante de decaimento da glicose

KO: knockout

LC-CoA: acil-coenzima A de cadeia longa

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MLDZ: doses baixas e múltiplas de estreptozotocina

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

MT1A: metalotioneína 1A

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NEM: N-etil-maleimida

NFκB: nuclear factor kappa B

NNT: nicotinamide nucleotide transhydrogenase

NO: óxido nítrico

NOX: NADPH oxidase

NOXA: ativador da NADPH oxidase

NOXO: organizador da NADPH oxidase

NRF2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2

O₂: oxigênio

O₂-: superóxido

OH': radical hidroxila

ONOO⁻: peroxinitrito

Orai: calcium release-activated calcium channel protein 1

OxD_{roGFP2}: grau de oxidação do roGFP2

PA: ácido palmítico

PBS: tampão fosfato salino

PDX-1: pancreatic and duodenal homeobox 1

PERK: quinase do retículo PKR-like

PFA: paraformaldeído

PI: iodeto de propídeo

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

PMA: 13-acetato de forbol 12-miristato

Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate

RE: retículo endoplasmático rugoso

RIRR: ROS-induced ROS-release; produção de EROs induzida por EROs

roGFP: proteína verde fluorescente sensível à redução e oxidação

RyR: receptor de rianodina

SEM: erro padrão da média

SERCA: bomba de Ca²⁺-ATPase do RE

SFB: soro fetal bovino

siRNA: RNA curto de interferência

SOCE: mecanismo de entrada de cálcio operada por estoque

SOD (1, 2 ou 3): superóxido dismutase

STAT-1: *signal transducer and activator of transcription 1*

STIM-1: transmembrane-spanning stromal interaction molecule 1

STZ: estreptozotocina

TBST: tris-buffered saline tween

TLR: receptor do tipo Toll-like

TNF: fator de necrose tumoral

UPR: resposta da proteína mal dobrada

WT: wild type

XBP1: proteína de ligação ao X-box 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇAO	26
1.1 Pâncreas: breve histórico e importância fisiológica	26
1.2 Células beta pancreáticas e a formação de insulina	28
1.3 Fisiologia da secreção de insulina	30
1.4 Diabetes mellitus	34
1.4.1 Breve histórico e atualidade	34
1.4.2 Diabetes mellitus do tipo 1 (DM1): insulite	35
1.4.3 Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2): glicolipotoxicidade	39
1.5 Estresse de retículo endoplasmático: na insulite e na glicolipotoxicidade	42
1.6 Estresse oxidativo: na insulite e na glicolipotoxicidade	46
1.6.1 Espécies reativas: dualidade de efeitos e remoção	46
1.6.2 Enzima NADPH oxidase	51
1.6.3 Enzima NADPH oxidase na fisiopatologia da célula beta pancreática	56
2 JUSTIFICATIVA	59
3 OBJETIVOS	60
3.1 Objetivo geral	60
3.2 Objetivos específicos	60
4 MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1 Cultura das linhagens de célula beta INS-1E e BRIN-BD11	62
4.2 Tratamento das linhagens de célula beta INS-1E e BRIN-BD11	62
4.3 Modelos animais	62
4.4 Análise da composição corporal	63
4.5 Homeostase glicêmica	64
4.5.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)	64
4.5.2 Teste de tolerância à insulina (ITT)	64
4.6 Isolamento e dispersão de ilhotas pancreáticas	64
4.7 Avaliação de Espécies Reativas e NAD(P)H	65
4.7.1 Avaliação da produção de superóxido com DHE	65
4.7.2 Avaliação da produção de H_2O_2 mitocondrial ou citosólico/nuclear e de NAD(I	P)H em
ilhotas roGFP2-Orp1	65
4.7.3 Avaliação da produção de H ₂ O ₂ em ilhotas NOX2 KO:roGFP2-Orp1	67
4.8 Secreção estática de insulina	67

4.9 Dosagem de insulina	68
4.10 Avaliação da homeostase de cálcio	68
4.11 Avaliação da expressão proteica por western blot	69
4.12 Viabilidade celular e apoptose	70
4.12.1 Kit Via Count (Millipore, Billerica, MA, EUA)	70
4.12.2 Marcação com iodeto de propídeo com FITC Annexin V Apoptosis Detect	ion Kit
with PI (BioLegend, California, EUA)	70
4.12.3 Fragmentação de DNA com Cell Death Detection ELISA kit (Sigma A	Aldrich,
Missouri, EUA)	70
4.12.4 Expressão proteica de caspase 3 clivada	71
4.13 Silenciamento de NOX2 pelo uso de siRNA	71
4.14 Avaliação de mRNA por RT-PCR em tempo real	71
4.15 Indução de DM1 por MLDZ	72
4.16 Coleta do pâncreas e inclusão do tecido em parafina	
4.16.1 Imunomarcação das ilhotas	73
4.17 Análise estatística	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Produção de EROs induzida por citocinas pró-inflamatórias em ilhotas pancr	
5.1.1 Produção de superóxido com a sonda DHE	
5.1.2 Variações temporais nos níveis de H_2O_2 citosólico/nuclear ou mitocondria	
NAD(P)H	
5.2 Papel de NOX na produção de EROs induzida por citocinas pró-inflamatón	
ilhotas pancreáticas	85
5.3 Caracterização dos animais NOX1 KO e NOX2 KO	88
5.3.1 Porcentagem de gordura corporal	
5.3.2 Homeostase glicêmica	89
5.4 Papel de NOX2 na funcionalidade de ilhotas expostas às citocinas pró-inflam	atórias
5.4.1 Secreção de insulina	
5.4.2 Homeostase de cálcio	
5.5 Papel de NOX no estresse de RE de ilhotas expostas às citocinas pró-inflam	atórias
-	101

5.6 Papel de NOX na viabilidade de células beta e ilhotas expostas às cito	cinas pró-
inflamatórias	105
5.7 Expressão gênica de isoformas da NOX após exposição às citocinas pró-inf	lamatórias
	109
5.8 Papel da NOX em modelos in vivo	111
5.8.1 Indução de DM1 com injeções intraperitoneais de estreptozotocina	111
5.8.2 Análise morfométrica e imunomarcação das ilhotas	116
5.9 Variações temporais nos níveis de H_2O_2 citosólico/nuclear ou mitocon	drial e de
NAD(P)H em ilhotas pancreáticas induzidas por ácido palmítico	125
5.10 Papel de NOX2 na produção de H ₂ O ₂ induzida por ácido palmítico	em ilhotas
pancreáticas	131
5.11 Papel de NOX2 na funcionalidade de ilhotas expostas ao ácido palmítico	136
5.11.1 Secreção de insulina	136
5.11.2 Homeostase de cálcio	138
5.12 Papel de NOX2 na viabilidade de ilhotas expostas ao ácido palmítico	142
5.13 Papel de NOX no estresse de RE de células beta pancreáticas exposta	s ao ácido
palmítico	144
6 CONCLUSÕES	147
REFERÊNCIAS	150
APÊNDICE A – Genotipagem de camundongos NOX2 KO:roGFP2-Orp1	163
APÊNDICE B – Artigos publicados no período	165
APÊNDICE C – Artigos aceitos / em revisão	170
APÊNDICE D – Manuscritos em preparação	170
APÊNDICE E – Apresentação de trabalho em congressos	171

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pâncreas: breve histórico e importância fisiológica

O pâncreas está localizado na região retroperitoneal, ou seja, atrás dos órgãos abdominais, mais especificamente entre o duodeno e o baço. Anatomicamente é dividido em quatro partes: cabeça, colo, corpo e cauda (1). Os primeiros relatos sobre sua existência são atribuídos a Herophilus de Alexandria, considerado o pai da anatomia, por volta de 300 a.C., ainda que essa autoria seja um pouco controversa; porém, sua função ficou completamente desconhecida até meados dos séculos XIX e XX (2). No século XVII, Johann G. Wirsüng descreveu pela primeira vez o ducto pancreático e, entre 1846 e 1849, Claude Bernard fez significativos progressos na descoberta da importância do pâncreas na digestão dos alimentos (2). Em 1869, Paul Langerhans descreveu a existência das células acinares no pâncreas, assim como a presença de pequenos aglomerados (*clusters*) de células, formando pequenas ilhas dispersas entre as células acinares, as quais mais tarde seriam chamadas de ilhotas de Langerhans (2).

Hoje sabemos que o pâncreas é uma glândula mista, composta por uma porção exócrina e uma porção endócrina, e possui duas funções vitais: a produção de enzimas digestórias e a regulação da homeostase da glicose. Tais funções vitais ficam evidentes pela morbidade e mortalidade associadas às doenças pancreáticas, como diabetes e câncer de pâncreas (3-6). A porção exócrina é formada pelos ácinos pancreáticos e é responsável pela produção de diversas enzimas digestórias que compõem o suco pancreático, liberado no duodeno e principal contribuinte para a digestão enzimática de proteínas, carboidratos e lipídeos presentes nos alimentos (1, 7). A porção endócrina representa cerca de 2% da massa total do pâncreas e é formada por aglomerados de células especializadas, denominados ilhotas pancreáticas ou ilhotas de Langerhans, responsáveis pela produção de diversos hormônios que são secretados na corrente sanguínea (1, 8).

Um pâncreas humano saudável contém aproximadamente 3,2 milhões de ilhotas, com diâmetro médio de $108,92 \pm 6,27 \, \mu m$ (9). As ilhotas pancreáticas são micro órgãos altamente vascularizados compostos por diferentes tipos de células endócrinas, cada uma responsável pela produção e liberação de um hormônio diferente (8). Os principais tipos celulares, bem como as proporções apresentadas dentro de cada ilhota em humanos são descritos a seguir (8, 10, 11). As células beta ou β representam cerca de 50-60% da massa da ilhota e são

responsáveis pela síntese e secreção de insulina em resposta ao aumento da glicemia pósprandial. As células alfa ou α representam cerca de 35% da massa da ilhota e são responsáveis pela síntese e secreção de glucagon, um dos hormônios contrarregulatórios da insulina, liberado no jejum (12). As células delta ou δ representam menos de 10% da massa da ilhota e são responsáveis pela síntese e secreção de somatostatina, regulador negativo da secreção de insulina, glucagon e polipeptídeo pancreático (13). As células PP representam menos de 5% da ilhota e são responsáveis pela síntese e secreção de polipeptídeo pancreático, inibidor da liberação de insulina (14). Por fim, as células ε representam menos de 1% da ilhota e são responsáveis pela síntese e secreção de grelina, liberada em jejum como modulador negativo da liberação de insulina (15). A quantidade de ilhotas pancreáticas presentes no pâncreas, bem como a porcentagem dos diferentes tipos celulares variam de acordo com a espécie, sendo as células beta sempre maioria (16, 17) (figura 1).

Outro parâmetro que varia de acordo com a espécie é o perfil de distribuição dos diferentes tipos celulares endócrinos dentro da ilhota, conhecido como arquitetura da ilhota. Em roedores, as células alfa e delta estão principalmente localizadas na periferia da ilhota, enquanto as células beta ficam concentradas na região central (figura 1). Este perfil de distribuição é diferente em ilhotas humanas, nas quais os diferentes tipos celulares estão dispersos por toda a ilhota (10, 11, 18) (figura 1). Tal arranjo "desorganizado" em ilhotas humanas facilita ainda mais a comunicação intercelular através de fortes interações parácrinas, de maneira que qualquer tipo celular possa influenciar qualquer outro tipo celular. Um parâmetro classicamente relacionado com a arquitetura da ilhota é a distribuição do suprimento sanguíneo. Uma clássica teoria sugere que as células beta recebem primeiro a irrigação sanguínea, que depois segue para as células alfa e delta, mesmo em ilhotas humanas (19). Muitos livros-texto trazem este conceito, porém alguns estudos também sugerem que haja um segundo padrão, no qual a irrigação sanguínea não é prioritária às células beta, de maneira que todas as células possuem acesso equivalente ao suprimento sanguíneo (11, 20).

Parasympathetic fibres

Sympathetic fibres

Sympathetic fibres

Sympathetic fibres

Primate

-5%

Rodent

-15%

Islet cell composition

Blood

vessels

Primate

-5%

Alpha cell

Delta cell

Delta cell

Figura 1 – Diferentes tipos celulares endócrinos em ilhotas de roedores e humanas.

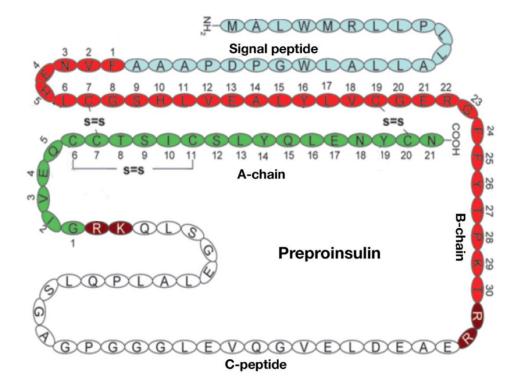
O quadro mostra a representação esquemática de uma ilhota de roedor (à esquerda) e uma ilhota humana (à direita), bem como a distribuição e proporção dos diferentes tipos celulares endócrinos. Em ambas as ilhotas, as células beta são a maioria: ~80% em roedores e ~65% em humanos. Em ilhotas de roedores, as células beta concentram-se na região central, enquanto células alfa (~15%) e células delta (~5%) estão localizadas na periferia. Em ilhotas humanas, os diferentes tipos celulares encontram-se dispersos por toda a ilhota. Fonte: Arrojo e Drigo R et al., 2015 (18).

1.2 Células beta pancreáticas e a formação de insulina

As células beta das ilhotas pancreáticas são responsáveis pela produção, armazenamento e liberação do hormônio peptídico insulina. Inicialmente, a insulina é sintetizada no polirribossomo na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RE), como pré-pró-insulina (figura 2). Assim que entra no RE, ela perde o peptídeo-sinal de aproximadamente 24 aminoácidos por clivagem enzimática, originando a pró-insulina, formada por uma cadeia de 21 resíduos de aminoácidos, conhecida como cadeia A ou α, unida a uma cadeia com 30 resíduos de aminoácidos, conhecida como cadeia B ou β; as cadeias A e B são unidas a uma terceira cadeia, conhecida como peptídeo conector ou peptídeo C (21-23) (figura 2). A pró-insulina é empacotada dentro de grânulos secretórios no Complexo de Golgi, enquanto proteases clivam o peptídeo C, formando finalmente a insulina (21-23). O hormônio

maduro é composto pela cadeia A unida por duas pontes dissulfeto (entre resíduos de cisteína) à cadeia B. Existe ainda uma terceira ponte dissulfeto entre resíduos de cisteína da cadeia A (figura 2) (21-23). As moléculas de insulina permanecem estocadas dentro dos grânulos secretórios, até que haja estímulo para sua liberação (22, 23).

Figura 2 – Estrutura da molécula de insulina.



A pré-pró-insulina é formada pelo peptídeo sinal (azul-claro), pela cadeia A (verde), pela cadeia B (vermelha) e pelo peptídeo C (branco). As duas pontes dissulfeto entre as cadeias A e B, bem como a ponte dissulfeto entre aminoácidos da cadeia A estão representadas.

Fonte: modificado de Liu M et al., 2018. (21)

Os grânulos secretórios possuem insulina, pró-insulina e peptídeo C. Cerca de 60% de toda insulina que é secretada é rapidamente removida pelo fígado através do mecanismo de primeira passagem, antes de atingir a circulação sistêmica. No entanto, o peptídeo C não é removido pelo fígado, sendo excretado intacto na urina. Como a quantidade de peptídeo C secretada é equimolar à quantidade de insulina secretada, os níveis de peptídeo C na urina podem ser utilizados como medida da capacidade secretória de insulina (24, 25).

Diversos nutrientes estimulam a secreção de insulina, como glicose, aminoácidos e ácidos graxos (AGs). No entanto, sua secreção é modulada, principalmente, pelas

concentrações plasmáticas de glicose, principal combustível fisiológico da célula beta (26-29).

A secreção de insulina apresenta um perfil bifásico: uma fase de liberação rápida dos grânulos previamente formados, seguida de uma fase de liberação lenta de grânulos previamente formados, juntamente com insulina recém-sintetizada (28, 30). Em indivíduos saudáveis, a concentração plasmática de glicose é altamente regulada e mantida dentro de uma faixa estreita, que varia entre 70 e 100 mg/dl (31, 32). Para isso, há um balanço delicado entre a secreção de insulina e de hormônios contrarregulatórios. Após a alimentação e consequente aumento plasmático de glicose, os níveis de insulina começam a aumentar em cerca de dois a cinco minutos na fase de liberação rápida (primeira fase) (28, 30). A segunda fase de liberação de insulina persiste até que seja capaz de restabelecer os níveis plasmáticos de glicose de volta para os níveis basais (28, 30).

1.3 Fisiologia da secreção de insulina

A secreção de insulina estimulada por glicose (*Glucose-Stimulated Insulin Secretion*: GSIS) segue uma regulação específica (figura 3), que tem início com a entrada da glicose, presente no plasma, na célula beta. A glicose entra através de difusão facilitada por transportador específico conhecido como *Glucose Transporter* (GLUT). Células beta de roedores e de humanos expressam GLUT-2, o qual possui um alto Km, ou seja, baixa afinidade pelo substrato (33). Como a ligação ao GLUT-2 é fraca, isto faz com que a glicose logo se separe de seu transportador. Dessa forma, sempre que houver aumento de concentração no meio extracelular, vai haver a entrada de glicose. Uma vez dentro da célula beta, a glicose é rapidamente fosforilada, sendo impedida de se difundir para o exterior da célula. A fosforilação da glicose é feita por uma hexoquinase, a qual no caso das células beta pancreáticas é a glicoquinase, primeira enzima da via glicolítica, gerando glicose-6-fosfato. A glicoquinase controla o metabolismo da glicose e é considerada um sensor de glicose; ela possui baixa afinidade por glicose, não é inibida por glicose-6-fosfato e possui um Vmáx elevado, resultando em uma rápida fosforilação (33).

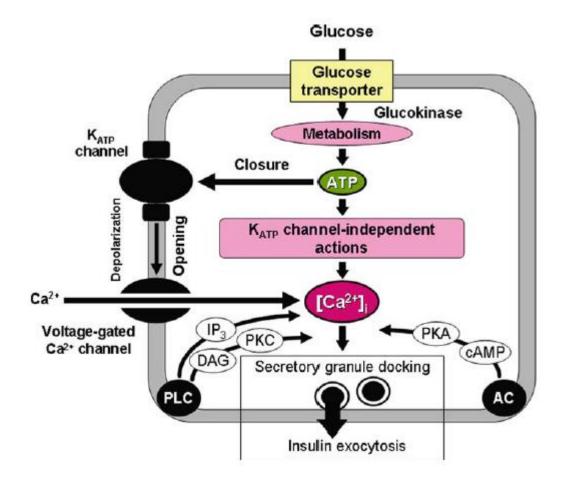
As reações da via glicolítica levam à geração de piruvato, com formação de ATP. O piruvato entra na matriz mitocondrial e é convertido em acetil-CoA, o qual é completamente oxidado pelo ciclo de Krebs, com geração de ATP e dos cofatores reduzidos NADH e FADH₂ (26-29). A partir daí ocorre a transferência de elétrons e dos íons H⁺ do NADH e do FADH₂

para a molécula de oxigênio, com formação de água (H₂O). No entanto, essa reação não é direta e ocorre através de transferências sequenciais a moléculas aceptoras, num processo conhecido como cadeia de transporte de elétrons ou fosforilação oxidativa, com eficiente geração de ATP.

A produção de ATP leva a um aumento da razão ATP/ADP no citosol, o qual provoca o fechamento dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) presentes na membrana plasmática. Estes canais são essenciais para a movimentação de íons pela membrana, permitindo a manutenção do potencial de membrana na faixa de -70 mV. A consequência do fechamento dos canais K_{ATP} é o acúmulo de K⁺ (carga positiva), levando a uma despolarização da membrana e consequente abertura dos canais para Ca²⁺ sensíveis à voltagem do tipo L. O Ca²⁺, normalmente mais concentrado no meio extracelular, entra nas células a favor de seu gradiente eletroquímico, levando ao aumento da concentração intracelular de Ca²⁺. O acúmulo de Ca²⁺ próximo à face interna da membrana plasmática é essencial para a ativação de proteínas do citoesqueleto pertencentes à maquinaria de exocitose e dependentes de Ca²⁺, levando à mobilização dos grânulos de insulina e sua consequente fusão com a membrana plasmática e secreção (34, 35).

A glicose e o aumento intracelular de Ca²⁺ também levam à ativação da adenilatociclase, levando à formação de AMP cíclico (cAMP), e da fosfolipase C (PLC), levando à formação de inositol-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O cAMP ativa a proteína quinase A (PKA) e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), ambas envolvidas na fosforilação de componentes do citoesqueleto da maquinaria de exocitose. O IP₃ promove a abertura dos canais para Ca²⁺, presentes na membrana do retículo endoplasmático, liberando mais Ca²⁺ para o citosol, num processo conhecido como liberação de Ca²⁺ induzida por Ca²⁺ (*Ca*²⁺ *induced-Ca*²⁺ *-release*), potencializando o processo secretório (26-28). Vale ressaltar que também já foram descritos mecanismos de GSIS independentes de K_{ATP} e/ou de Ca²⁺ (36-39).

Figura 3 – Vias intracelulares envolvidas na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) em células beta pancreáticas.



A glicose entra na célula beta por transportadores específicos e é rapidamente convertida a glicose-6-fosfato pela glicoquinase. O metabolismo de glicose provoca o aumento intracelular de ATP, levando ao fechamento dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) presentes na membrana plasmática, o que promove despolarização da membrana e subsequente abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. Tais efeitos culminam com o influxo intracelular de Ca^{2+} , responsável por induzir o recrutamento dos grânulos de insulina para a membrana, bem como sua fusão com a membrana e secreção. Os eventos desencadeadores da secreção de insulina também são modulados pelas vias: fosfolipase C (PLC) / proteína quinase C (PKC) e adenilato ciclase (AC) / proteína quinase C (PKA).

Fonte: Newsholme P et al., 2010 (28).

Além da glicose, outros nutrientes como alguns aminoácidos e AGs também podem levar ao aumento da secreção de insulina. No caso dos AGs, uma vez dentro das células beta, eles são convertidos a acil-CoAs de cadeia longa (LC-CoAs) por ação da acil-CoA sintetase. Em situações de baixa glicose, eles são transportados para dentro da mitocôndria para serem completamente oxidados a acetil-CoA, num processo conhecido como β-oxidação (40). Isto ocorre com AGs de cadeia curta (<C₈), média (C₈-C₁₂) e longa (C₁₄-C₂₀), enquanto AGs de cadeia longa (C₁₄-C₂₀) e muito longa (>C₂₀) são oxidados nos peroxissomos (40, 41). O transporte para dentro da mitocôndria depende do transportador carnitina-palmitoil transferase

tipo I (CPT-I). Quando os níveis plasmáticos de glicose aumentam, o metabolismo da glicose gera malonil-CoA, o qual inibe a CPT-I, impedindo o transporte de LC-CoA para dentro da mitocôndria. O LC-CoA acumulado no citosol leva à ativação de PKC, a qual promove a acilação de proteínas envolvidas na exocitose dos grânulos de insulina (42-46). Dessa forma, os AGs podem amplificar a GSIS.

Outro mecanismo pelo qual AGs aumentam a secreção de insulina é via ativação de receptores de membrana acoplados à proteína G, conhecidos como GPRs (47-50). Existem vários tipos de GPRs ativados por AGs com diferentes comprimentos de cadeia carbônica. Um dos mais estudados é o GPR40, ativado por AGs de cadeia média e longa, saturados ou insaturados, como os ácidos palmítico e oleico (43, 47, 49). A ligação do AG ao GPR40 ativa a proteína Gq, provocando estímulo da PLC, levando à formação de DAG e IP₃, que, como descrito anteriormente, ativa a PKC e mobiliza cálcio do retículo endoplasmático, respectivamente (49, 51-54). O GPR40 é expresso em ilhotas pancreáticas de ratos e camundongos (47) e em linhagens celulares secretoras de insulina (42, 43) e por provocar aumento da secreção de insulina tem sido estudado como um alvo promissor no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) (47, 55-61).

Apesar de muitas células somáticas expressarem receptores de insulina, seus principais efeitos na regulação da homeostase da glicose ocorrem no tecido adiposo, músculo esquelético e fígado. A insulina é o principal hormônio anabólico, ou seja, favorece a formação das reservas energéticas e inibe sua degradação (62). Mais especificamente, no tecido adiposo, a insulina aumenta a captação de glicose (via GLUT-4) e de AGs e estimula a esterificação dos AGs intracelulares, favorecendo a formação dos triglicerídeos (lipogênese), além de inibir a degradação da reserva de triglicerídeos (lipólise) (62). No músculo esquelético, ela aumenta a captação de glicose (via GLUT-4) e a síntese de glicogênio (polímero de moléculas de glicose) e aumenta a captação de aminoácidos, promovendo a síntese e inibindo a degradação proteica (62). No fígado, a glicose entra via GLUT-2, o qual não sofre influência da insulina. Porém, a insulina estimula a formação de glicogênio e a lipogênese e inibe a liberação de glicose por inibição da quebra de glicogênio (glicogenólise) e da gliconeogênese (62). A insulina também estimula a translocação de GLUT para a membrana plasmática nos tecidos-alvo, estimulando a captação de glicose (63).

A perda parcial ou total da produção da insulina leva a uma condição de hiperglicemia, conhecida como diabetes *mellitus* (64).

1.4 Diabetes mellitus

1.4.1 Breve histórico e atualidade

O diabetes *mellitus* (DM) foi descrito ainda na antiguidade, por volta de 1500 a.C., como uma doença caracterizada por produção abundante e excessiva de urina (poliúria) (65). Ainda no século II a.C. a doença foi batizada de diabetes, que significa "passar por um cifão", em referência à incessante perda de líquidos pela poliúria (65). O termo *mellitus*, mel em latim, foi utilizado muitos anos depois, no século XVII, em referência ao açúcar presente na urina de indivíduos com a doença (65).

Indivíduos diabéticos sofreram por séculos com esta debilitante doença, sem formas apropriadas de tratamento para alívio dos sintomas. Dentre os primeiros possíveis tratamentos para o diabetes eram sugeridos ópio e sangrias, além de diversos protocolos de rígida restrição alimentar, principalmente de carboidratos, de maneira bastante empírica (65). Apesar de todos os esforços, os pacientes tinham baixa qualidade, e enquanto alguns viviam por alguns anos nesta condição, outros morriam dentro de pouco tempo após o desenvolvimento da doença, o que fez os cientistas pensarem na existência de duas doenças diferentes.

Pesquisadores passaram muitos anos associando o distúrbio com possíveis falhas na função renal e apenas em 1788, durante uma autópsia de uma pessoa diabética, Thomas Cawley percebeu que o pâncreas apresentava-se murcho (65). A observação passou despercebida até que em 1889 Joseph von Mering e Oscar Minkowski descobriram que a remoção do pâncreas de um cachorro o fazia desenvolver diabetes (2, 65). Logo após, Moses Barron percebeu, durante a autópsia de um diabético, que as ilhotas de Langerhans (descobertas por Paul Langerhans em 1869) estavam danificadas e sugeriu que elas poderiam ser as responsáveis pela produção de uma substância que deveria ser um anti-diabético; tal substância foi batizada de insulina por sir Edward Sharpey-Schafer por volta de 1910 (2, 65).

Somente entre 1921 e 1922, Frederick G. Banting e Charles H. Best trabalhando no laboratório do professor John J.R. Macleod conseguiram isolar a insulina de cachorros saudáveis e provar que sua injeção em cachorros com diabetes era capaz de baixar a glicemia. Com a ajuda de James B. Collip conseguiram obter grandes quantidades de insulina purificada para confirmar sua efetividade em humanos. A obtenção da insulina foi uma revolução e rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina aos pesquisadores em 1923 (2, 65).

Hoje sabemos que o DM é uma doença crônica e progressiva que se caracteriza por alterações da secreção de insulina, ligadas ou não à deficiência na ação do hormônio. Dessa forma, há uma incapacidade em controlar os níveis plasmáticos de glicose, levando à hiperglicemia crônica, ou seja, tanto em jejum como no período pós-prandial. As duas principais formas de diabetes são a tipo 1 (DM1) e a tipo 2 (DM2) e ambas são caracterizadas por uma disfunção progressiva da célula beta (64).

O número de casos de DM tem aumentado de maneira alarmante no mundo todo e, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, há mais de 13 milhões de diabéticos atualmente no Brasil, o que representa aproximadamente 6,9 % da população brasileira (66). Além disso, o Brasil é hoje o terceiro país do mundo que mais gasta com despesas em saúde relacionadas ao diabetes, atrás apenas dos Estados Unidos (EUA) e da China (67).

O DM2 é a forma mais comum de diabetes, compreendendo cerca de 90 % dos casos, e o DM1 compreende 5-10 % dos casos de diabetes. A Associação Americana de Diabetes (ADA) caracteriza o DM1 como uma absoluta deficiência de insulina, decorrente de uma destruição autoimune progressiva das células beta pancreáticas e o DM2 como uma perda progressiva de secreção de insulina no contexto de graus variados de resistência periférica à ação do hormônio (64). A fisiopatologia do DM1 e DM2 é fundamentalmente distinta, porém ambas culminam com a disfunção da célula beta pancreática. No DM1 há uma resposta autoimune e perda massiva de células beta, enquanto no DM2 há uma resposta mediada por mecanismos metabólicos e perda leve a moderada de células beta (68, 69). O desfecho comum é a hiperglicemia e suas complicações associadas, tais como retinopatia, disfunção renal, neuropatia, além de aterosclerose e hipertensão. As complicações crônicas do diabetes são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos e um estudo recente no Brasil indica que indivíduos diabéticos apresentam uma mortalidade entre 2,76 e 1,88 vezes maior em homens e 2,38 e 1,42 vezes maior em mulheres, quando comparados com pessoas saudáveis na mesma faixa etária (6).

1.4.2 Diabetes mellitus do tipo 1 (DM1): insulite

Apesar da baixa incidência, comparado ao DM2, o DM1 é uma condição bastante preocupante. A falta de diagnóstico e tratamento em pessoas com DM1 leva ao desenvolvimento de cetoacidose, uma emergência médica que pode levar, entre outros sintomas, a confusão mental, diminuição do nível de consciência e morte (70). Além das

complicações associadas à progressão da doença, o tratamento dos pacientes com DM1 depende essencialmente do controle da dieta, associado ou não à prática de exercício físico, juntamente com a administração de insulina exógena ao longo de toda a vida, quer seja por injeções diárias ou por bombas de infusão de insulina. É necessário um grande grau de controle para evitar episódios de hiperglicemia ou hipoglicemia e alguns pacientes desenvolvem um quadro de diabetes hiperlábil, com oscilações instáveis da glicemia. Os recorrentes episódios de hipoglicemia severa estão associados a danos cerebrais com prejuízo da função cognitiva (71-74).

O DM1 é instalado devido a um ataque autoimune específico às células beta pancreáticas, que se inicia por invasão de células mononucleares, como macrófagos e linfócitos T, no microambiente da ilhota, desencadeando uma resposta inflamatória específica e persistente, conhecida como insulite, com massiva destruição das células beta. A contribuição dos mediadores inflamatórios pode ser dividida em três fases: i) indução, ii) amplificação e iii) manutenção ou resolução (75).

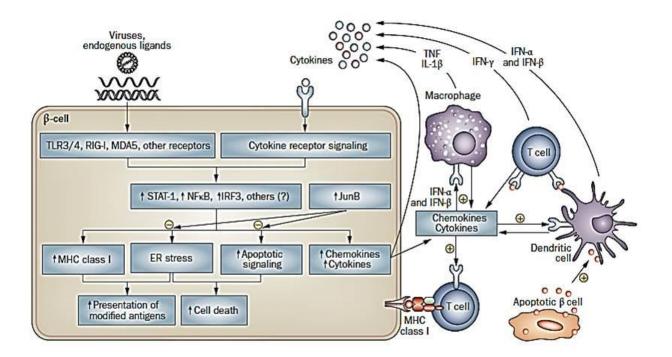
Ainda há controvérsias sobre qual seria o sinal para indução, mas sabe-se que o DM1 é uma doença multifatorial, na qual fatores ambientais disparam uma resposta autoimune específica às células beta pancreáticas em indivíduos com predisposição genética. Diversos genes já foram associados a essa maior predisposição ao desenvolvimento de DM1 (76, 77), assim como diversos fatores ambientais também já foram descritos como possíveis fatores desencadeadores, como diferenças na composição da microbiota intestinal e algumas infecções virais (78). Por exemplo, sabe-se que alguns componentes da resposta imune inata, como receptores do tipo Toll-like (TLRs), contribuem para o desenvolvimento da insulite (75). Em algumas infecções virais, por exemplo, há aumento da expressão de alguns TLRs e a ligação de material genético viral a esses TLRs pode levar a apoptose e liberação de citocinas inflamatórias. A inflamação local juntamente com mecanismos de sinalização intracelular normalmente é benéfica para eliminar ou neutralizar o vírus invasor. No entanto, em indivíduos geneticamente predispostos, as tentativas de eliminar o vírus podem levar a uma resposta inflamatória exacerbada e/ou defeitos em mecanismos intracelulares, levando à fase chamada de amplificação (75).

Na fase de amplificação, temos a transição entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa, com potencial de gerar uma reação autoimune prolongada. Durante a progressão da doença, várias citocinas pró-inflamatórias, principalmente Interleucina 1- β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon- γ (IFN- γ), são liberadas nas ilhotas

pancreáticas pelos infiltrados de macrófagos e linfócitos T durante a insulite (69, 75). As citocinas liberadas por células do sistema imune inato recrutam e ativam as células do sistema imune adaptativo e modulam a atividade de várias cascatas de sinalização destrutivas, provocando prejuízo da função e morte das células beta, principalmente por apoptose (75). Há um "diálogo" entre as células imunes e as células beta durante a insulite, onde macrófagos ativados, células *natural killer* e linfócitos T produzem citocinas pró-inflamatórias, as quais induzem células beta a secretarem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, atraindo mais células mononucleares que, por sua vez, também vão liberar mais quimiocinas (figura 4). Caso esse ciclo vicioso seja interrompido, há a resolução do quadro inflamatório, mas caso não seja, irá evoluir para acúmulo progressivo de macrófagos ativados e células T ao redor das ilhotas, determinando a manutenção do quadro inflamatório e progressão do DM1.

Durante décadas, cientistas têm utilizado culturas de linhagens de células beta e ilhotas de roedores e humanas expostas às citocinas, individualmente ou em combinação, para desvendar os mecanismos intracelulares envolvidos na disfunção e morte das células beta durante a insulite (69, 79-82). Alguns dos mecanismos estão esquematizados nas figuras 4 e 5. Citocinas são proteínas reguladoras e imunomoduladoras envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos. As citocinas liberadas durante a insulite (particularmente IL-1β, TNF e INF-γ) ligam-se a receptores específicos localizados na membrana das células beta, levando à ativação de fatores de transcrição intracelulares, como o Nuclear factor kappa B (NFκB) e Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1), os quais possuem papel crucial no controle de múltiplos genes que desencadeiam diversos mecanismos intracelulares (69, 80). Dentre os principais mecanismos destacam-se: i) a ativação de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e consequente produção excessiva de óxido nítrico (NO), envolvido no estresse nitrosativo; ii) depleção de Ca²⁺ e indução do estresse de retículo endoplasmático (RE); iii) geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente estresse oxidativo; iv) alteração do potencial de membrana mitocondrial, com liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol e consequente ativação de caspases 9 e 3. Todos esses mecanismos interligados contribuem para os efeitos deletérios envolvidos na biossíntese e secreção de insulina e culminam na apoptose (69, 75, 80). Os fatores de transcrição NFkB e STAT-1 também estão envolvidos na liberação de citocinas e quimiocinas e expressão de antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I pelas próprias células beta (75).

Figura 4 – Interação entre as células beta das ilhotas pancreáticas e as células do sistema imune durante a insulite e o desenvolvimento de DM1.



As citocinas liberadas pelo sistema imune inato são reconhecidas por receptores específicos presentes na membrana da célula beta pancreática. Tal ligação desencadeia a ativação de diversos fatores de transcrição (ex. STAT-1 e NFkB), os quais induzem a liberação de quimiocinas e citocinas que recrutam e ativam mais células do sistema imune adaptativo, aumentam a expressão de antígenos MHC classe I pelas próprias células beta e ativam sinais pró-apoptóticos que levam à morte da célula beta. As citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo sistema imune contribuem para a manutenção e amplificação da rede descrita. Forma-se um ciclo vicioso que resulta numa destruição seletiva e progressiva das células beta pancreáticas. Fonte: Eizirik DL et al., 2009 (75).

A destruição autoimune das células beta é a marca do DM1 e persiste por anos até que cerca de 70 a 80 % da massa de células beta sejam perdidos, momento em que a hiperglicemia aparece e a doença é praticamente irreversível (69). Ainda existem lacunas a serem preenchidas em relação aos mecanismos moleculares envolvidos na instalação da insulite, que poderiam ser a chave para desenvolver estratégias específicas para sua modulação, na tentativa de preservar a função e a massa de célula beta e evitar o estabelecimento completo da doença.

IFN-y IL-1_B **FasL** II ∱ Fas ∱NF-κB ↑ IRF-1 Other JNK genes (?) Transcription factor p38 ↑Caspase 1 and gene networks **↑Bid** † iNOS Apoptosis Caspase 3 tBid NO Caspase 12 (?) Caspase 9 **†Bak** p53 Bcl-xL **↑** CHOP

Figura 5 – Vias intracelulares desencadeadas durante a insulite em células beta pancreáticas.

A ligação das citocinas inflamatórias aos seus receptores específicos localizados na membrana da célula beta desencadeia a ativação dos fatores de transcrição NFκB e STAT-1. A ativação desses fatores de transcrição leva à ativação de vias que culminam com a apoptose da célula, tais como: ativação de iNOS e maior produção de NO, liberação de citocromo c pela mitocôndria para o citosol, ativação da via das caspases e indução do estresse de retículo endoplasmático.

Ca2+

Fonte: Cnop M et al., 2005 (69).

Free

radicals

BcI-2

1.4.3 Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2): glicolipotoxicidade

Bax

Cyt C

release

Mitochondria

O DM2 é o tipo mais frequente de DM e uma das doenças mais prevalentes no mundo (83). Seu desenvolvimento está associado a estilos modernos pouco saudáveis, com baixa atividade física e dietas ocidentais com alta ingestão calórica, principalmente de alimentos ricos em carboidratos e gordura saturada (83). Apresenta um componente genético importante, com alta incidência familiar (84). Obesidade, dislipidemia, hipertensão, aterosclerose e DM2 fazem parte de um conjunto de doenças que possuem incidência aumentada com a idade e costumam coexistir, aumentando o risco de doenças cardíacas, condição conhecida como síndrome metabólica (85).

O DM2 é uma doença que se instala progressivamente ao longo dos anos. Os pacientes apresentam prejuízos na secreção de insulina, associada ao declínio da ação da insulina em tecidos-alvo (músculo esquelético, fígado e tecido adiposo), condição conhecida como

ER Stress

Endoplasmic Reticulum

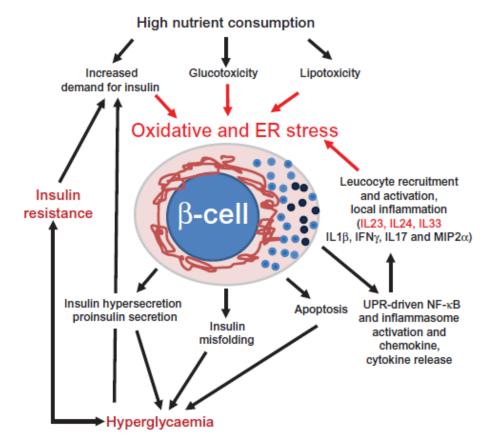
resistência à insulina. Antes da instalação completa da doença, temos uma condição conhecida como pré-diabetes, na qual o paciente apresenta hiperinsulinemia e resistência à insulina, com glicemia maior do que os valores considerados normais, porém ainda abaixo dos valores utilizados como critério para classificação como DM2 (86). Nota-se que a maioria dos indivíduos obesos desenvolve resistência à insulina, porém nem todos desenvolvem DM2. Isto ocorre porque, num primeiro momento, as células beta pancreáticas conseguem aumentar a produção de insulina de maneira suficiente para superar o declínio da responsividade dos tecidos periféricos. Conforme a concentração plasmática de glicose no jejum aumenta, a concentração plasmática de insulina no jejum aumenta progressivamente, como uma resposta adaptativa das células beta em tentar manter a homeostase de glicose.

Com a manutenção da resistência à insulina e hiperglicemia crônica, as células beta são expostas prolongadamente a altas concentrações de glicose, o que pode levar a prejuízo na transcrição gênica e menor síntese e secreção de insulina (87-90). As células beta, então, começam a entrar em falência, tornando-se incapazes de aumentar ainda mais a secreção de insulina, com consequente indução de apoptose em algumas células. Como resultado, temos a concentração plasmática de insulina diminuída e a persistência da hiperglicemia. Como a insulina inibe a produção hepática de glicose em situações fisiológicas, durante a resistência à insulina há aumento de produção hepática de glicose, piorando ainda mais o cenário. Além disso, por causa da resistência à insulina no tecido adiposo, há lipólise aumentada e liberação de AGs livres na corrente sanguínea, que permanecem cronicamente elevados, piorando ainda mais a resistência à insulina e provocando defeitos na função e morte da célula beta (87-90).

A exposição crônica das células beta a altas concentrações de glicose e AGs, principalmente saturados, e os prejuízos associados ao excesso de nutrientes é uma condição conhecida como glicolipotoxicidade (87-90). Em vários estudos, a exposição crônica de linhagens de células beta e de ilhotas de roedores e de humanos em cultura com altas concentrações de glicose e de AGs saturados, principalmente o ácido palmítico, ajudaram a desvendar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na glicolipotoxicidade, bem como suas consequências (91) (figura 6). A exposição crônica a nutrientes e alta demanda de produção de insulina, provoca nas células beta aumento de EROs e consequente estresse oxidativo, além de aumento de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE, por aumento de demanda de síntese proteica, e desbalanço de Ca²⁺ no RE, levando ao estresse de RE (91). Os fenômenos estão interligados e podem iniciar a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias, as quais atraem e ativam células imunes no microambiente da ilhota (91)

(figura 6). Todos os estresses são exacerbados, levando ao distúrbio da função secretória, culminando com a apoptose das células beta (69, 91).

Figura 6 – Vias envolvidas na glicolipotoxicidade durante o desenvolvimento do DM2.



Durante a obesidade e nos estágios iniciais de diabetes, o alto consumo de nutrientes leva ao aumento na demanda de síntese de insulina e o desenvolvimento de moderada resistência à insulina e hiperglicemia. Em resposta, as células beta aumentam a biossíntese de insulina, levando a um moderado estresse oxidativo e estresse de retículo, exacerbados por aumento na concentração circulante de glicose e ácidos graxos saturados. A produção de quimiocinas ativa células inflamatórias no microambiente da ilhota. Com o prolongado alto consumo de nutrientes, a resistência à insulina aumenta nos tecidos periféricos, aumentando ainda mais a demanda por produção e secreção de insulina. Os estresses oxidativo e de retículo são exacerbados, prejudicando a produção de insulina e a função secretória. Os níveis de pró-insulina / insulina aumentam na corrente sanguínea, prejudicando a sinalização da insulina em tecidos periféricos, exacerbando ainda mais a hiperglicemia. Com o tempo, a produção de insulina diminui e a apoptose da célula beta aumenta. Fonte: Hasnain SZ et al., 2016 (91).

Deste modo, os fatores causais para cada forma de DM são diferentes: citocinas inflamatórias no DM1 versus altas concentrações de glicose e AGs saturados no DM2. Enquanto no DM1 há um ataque imune mediado e perda massiva da massa de células beta por apoptose, no DM2 há uma perda bem menor de células beta, em torno de 20%. Portanto, provavelmente o prejuízo na secreção de insulina no DM2 é devido essencialmente à disfunção das células beta, enquanto a perda da massa dessas células ocorre com o passar dos

anos (68). Vale ressaltar que apesar da elevação de citocinas pró-inflamatórias ser uma característica associada principalmente ao desenvolvimento de DM1, há evidências indicando que uma inflamação crônica de baixo grau e o aumento de citocinas pró-inflamatórias na circulação são características encontradas no DM2 (92-95).

Algumas vias ativadas durante o desenvolvimento de ambas as formas de DM são similares, como o estabelecimento do estresse de RE e do estresse oxidativo (96, 97). Ambos os estresses são processos biológicos altamente interconectados que regulam uma ampla variedade de passos de sinalização na célula. Dessa forma, eles impactam profundamente a fisiologia, assim como formam um ciclo vicioso em uma grande variedade de condições patológicas, incluindo doenças metabólicas, neurodegenerativas e inflamatórias (98). Muitas causas patológicas, ambientais e genéticas são propostas como indutoras do estresse de RE e estresse oxidativo em células beta, incluindo glicotoxicidade, lipotoxicidade e desafio inflamatório (97, 99). Portanto, terapias que tenham como alvo ambos os estresses podem ser mais efetivas para tratar tais doenças.

1.5 Estresse de retículo endoplasmático: na insulite e na glicolipotoxicidade

O retículo endoplasmático rugoso (RE) está presente em células eucarióticas. Ele apresenta ribossomos associados à sua membrana e é de fundamental importância em células com alta demanda de síntese proteica, como células secretoras, caso das células beta pancreáticas. As proteínas que serão secretadas são traduzidas a partir de RNAs mensageiros (mRNA) pelos ribossomos associados à membrana do RE, e possuem um peptídeo-sinal que as direcionam para o RE. No RE, as proteínas sofrem algumas modificações pós-traducionais, tais como dobramento ou enovelamento adequado, formação de pontes dissulfeto, glicosilação, acetilação, ubiquitinação, entre outras (100, 101), o que determina suas estruturas terciária e quaternária e propicia que tenham função adequada (100, 101).

O processamento adequado de proteínas é um dos mecanismos mais conservados dentre as funções celulares. O RE possui um mecanismo de controle altamente regulado, o qual permite que somente as proteínas adequadamente dobradas sigam para o Complexo de Golgi, onde podem sofrer modificações adicionais e então seguir seu destino final, como no caso das proteínas que serão secretadas.

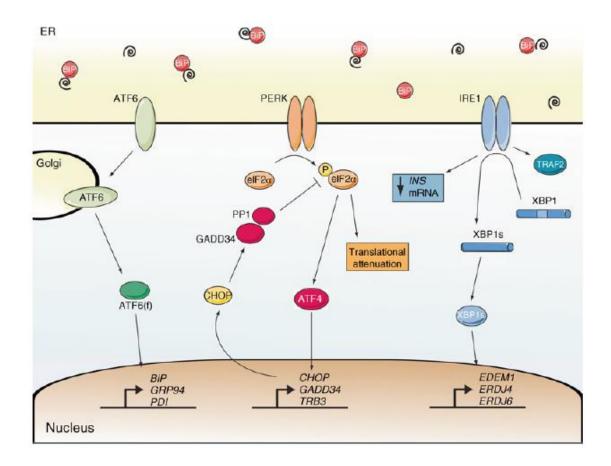
O estresse de RE é causado por acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas no lúmen do RE, que pode ser desencadeado por diversas perturbações, tais como: aumento da demanda de síntese proteica, falhas na tradução proteica, falhas no dobramento/exportação

de proteínas recém-sintetizadas, alterações no ambiente redox do RE, escassez de enzimas de dobramento ou chaperonas, depleção de Ca²⁺ do RE, entre outras. A partir daí, um mecanismo de segurança, chamado de resposta da proteína mal dobrada (UPR), é ativado e tem como objetivo garantir que as proteínas sejam montadas de forma adequada para restaurar a homeostase do RE (81, 102-105).

Na UPR são desencadeados vários processos, entre eles: i) aumento da transcrição de chaperonas e outras proteínas envolvidas no dobramento e maturação proteica, a fim de aumentar a atividade de dobramento de proteínas e prevenir a agregação proteica; ii) atenuação da tradução de proteínas em geral, a fim de reduzir a síntese proteica e prevenir acúmulo adicional de proteínas mal dobradas; iii) indução de degradação de proteínas mal dobradas via complexo de degradação associada ao retículo (ERAD) (81, 102-105). Quando o estresse de RE é severo e prolongado e a UPR não é capaz de restabelecer a homeostase, uma resposta de morte celular por apoptose é ativada e envolve fatores de transcrição mediadores da apoptose (ex. proteína homóloga a C/EBP: CHOP), quinases (ex. c-Jun N-terminal quinase: JNK) e caspases (81, 102-105).

A UPR é mediada pela ativação de três proteínas transmembrana, que representam os três eixos da UPR, e estão localizadas na membrana do RE (figura 7). São elas: enzima que requer inositol 1 (IRE1), quinase do retículo PKR-like (PERK) e fator de ativação da transcrição 6 (ATF6). Estas três proteínas são inibidas pela ligação com a chaperona BiP em condições normais (81, 102-105). Quando há o acúmulo de proteínas mal enoveladas, a BiP desliga-se dessas proteínas, permitindo sua ativação. A ativação da IRE1 leva ao splicing do mRNA da proteína de ligação ao X-box 1 (XBP1), a qual é então traduzida em XBP1s, um fator de transcrição que regula genes envolvidos no dobramento e maturação de proteínas, como as chaperonas, além de proteínas envolvidas no ERAD (81, 102-105). A ativação de PERK leva à fosforilação da subunidade α do fator eucariótico de iniciação da tradução (eIf2α), provocando inibição geral do processo de tradução de proteínas. Ao mesmo tempo, há a indução da tradução de ATF4 que, entre outros genes, modula a expressão de CHOP; ATF4 e CHOP estão envolvidos no aumento da regulação transcricional da resposta apoptótica (81, 102-105). O fator de transcrição ATF6 é translocado para o complexo de Golgi, onde é clivado, liberando sua forma ativa, a qual induz a transcrição de chaperonas de RE que vão auxiliar no enovelamento de proteínas (81, 102-105), como exemplificado na célula beta pancreática na figura 7.

Figura 7 – Representação esquemática da Resposta da Proteína Mal Dobrada (UPR) e ativação do estresse de retículo endoplasmático na célula beta pancreática.

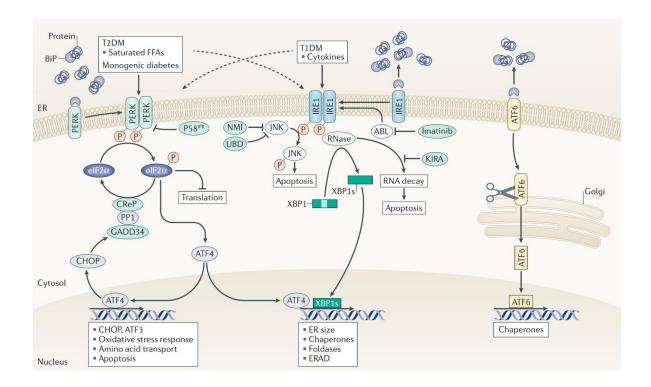


Em condições de homeostase, a chaperona BiP está ligada às proteínas ATF6, PERK e IRE1, presentes na membrana do retículo endoplasmático, ligação esta que mantem as proteínas em seu estado inativo. Com o acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo, a BiP irá se ligar preferencialmente a elas na tentativa de auxiliar em seu dobramento adequado. O desligamento de BiP de ATF6, PERK e IRE1 faz com que estas proteínas sejam ativadas. O ATF6 é translocado para o complexo de Golgi onde é clivado por proteases. O fragmento gerado, ATF6(f), é um fator de transcrição que modula a expressão de chaperonas e enzimas necessárias para função do retículo. A ativação de PERK por autofosforilação leva à fosforilação e inativação de eIf2α, o qual é um fator-chave na iniciação da tradução de proteínas. A fosforilação de eIf2α inibe a tradução global de proteínas, diminuindo a demanda de dobramento do retículo. Por outro lado, a tradução de alguns mRNAs é positivamente regulada, como ATF4, o qual induz CHOP. Este, por sua vez, regula a proteína GADD34, a qual ativa uma proteína fosfatase que defosforila elf2α, permitindo, através de um mecanismo de feedback negativo, que a síntese proteica seja retomada. A ativação de CHOP também está envolvida na indução de apoptose. O ramo mais conservado da UPR é mediado por IRE1, o qual é ativado por autofosforilação. Uma vez ativo, possui atividade de endorribonuclease e ativa o fator de transcrição XBP1. A forma ativa de XBP1 (XBP1s) induz a transcrição de genes envolvidos no dobramento e maturação de proteínas e degradação de proteínas mal dobradas. IRE1 também pode ativar TRAF2, contribuindo para ativação de JNK e NFκB. Fonte: Eizirik DL et al., 2013 (81).

Como discutido anteriormente, as células beta pancreáticas são células secretoras que possuem um RE altamente desenvolvido, necessário para estoques de Ca²⁺, biossíntese de insulina e dobramento de pró-insulina recém-sintetizada. A célula beta possui uma elevada atividade na via sintética secretora e estudos sugerem que o eixo IRE1/XBP1 esteja em uma leve ativação permanente, permitindo-lhes responder rapidamente ao aumento da demanda de síntese e secreção de insulina, sendo crucial para o bom funcionamento das células beta (106). Por causa da alta taxa de síntese proteica, a formação de algumas proteínas mal dobradas é inevitável, aumentando a probabilidade de acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, tornando as células beta particularmente sensíveis ao estresse de RE (102). Portanto, os processos desencadeados pela UPR são essenciais para a adaptação celular às mudanças na demanda de síntese proteica e são particularmente cruciais para o desenvolvimento, a função e sobrevivência das células beta pancreáticas.

Diversos estudos mostram que a exposição de linhagens de células beta e de ilhotas a combinações de citocinas pró-inflamatórias e a altas concentrações de glicose e/ou AGs saturados induz o estresse de RE e consequente ativação da UPR (68, 69, 81, 82, 104, 107). Portanto, a ativação do estresse de RE parece ser uma via comum na disfunção e morte das células beta no DM1 e no DM2. Porém, aparentemente o estresse de RE afeta as células beta no DM1 via principalmente IRE1/XBP1, enquanto no DM2 principalmente via PERK/eIF2α (68) (figura 8).

Figura 8 – Diferentes eixos da UPR preferencialmente ativados em células beta pancreáticas durante o desenvolvimento do DM1 e DM2.



Durante o ataque autoimune característico do diabetes tipo 1 (DM1), há ativação preferencial do eixo IRE1/XBP1, pela ação das citocinas. Durante a lipotoxicidade característica do diabetes tipo 2 (DM2), há ativação preferencial do eixo PERK/eIF2 α .

Fonte: Eizirik DL et al., 2020 (68).

1.6 Estresse oxidativo: na insulite e na glicolipotoxicidade

1.6.1 Espécies reativas: dualidade de efeitos e remoção

O oxigênio é vital para a geração de energia pelas células do nosso organismo. Como já mencionado, durante o metabolismo energético celular, o oxigênio é o aceptor final de elétrons e íons hidrogênio, permitindo uma geração eficiente de ATP na fosforilação oxidativa mitocondrial. Portanto, as reações de oxidação e redução (redox) são fundamentais para manutenção da vida, através da respiração, do metabolismo e suprimento de energia. Porém, ao utilizar o oxigênio, as células podem gerar espécies reativas.

Existem vários sistemas enzimáticos produtores de espécies reativas, como os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons da matriz mitocondrial, peroxissomos, xantina oxidase, peroxidases lipídicas, RE, enzimas da família do citocromo P450 e as

NADPH oxidases (108-113). As espécies reativas podem ser de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERNs) e são átomos ou moléculas de oxigênio ou nitrogênio quimicamente reativas, formadas pelas células por reações redox durante o metabolismo aeróbio normal ou alterado. EROs e ERNs são moléculas ubíquas e reativas que compreendem: i) radicais livres, que apresentam um átomo de oxigênio ou nitrogênio com elétrons desemparelhados na sua camada mais externa, como o óxido nítrico (NO*), o superóxido (O2*) e o radical hidroxila (OH*) e ii) espécies reativas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H2O2). As EROs e ERNs também podem ser divididas entre ânions, como O2* e peroxinitrito (ONOO*), e não-ânions, como o H2O2 (114).

A transferência de elétrons entre moléculas aceptoras durante a fosforilação oxidativa mitocondrial é bastante eficiente, no entanto, há normalmente cerca de 2% de vazamento de elétrons, levando à geração de superóxido, o qual é rapidamente convertido em H₂O₂ por ação enzimática. O RE também é uma fonte de produção de H₂O₂ durante o dobramento oxidativo de proteínas. Durante a formação de pontes dissulfeto, o O₂ é aceptor final de elétrons, levando à formação de H₂O₂ e, como as células beta produzem grandes quantidades de insulina e cada molécula necessita da formação de três pontes dissulfeto, há elevada produção de H₂O₂ no RE (111).

EROs também são ferramentas fundamentais produzidas por células do sistema imune como defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos, além de serem importantes segundomensageiros que atuam como moléculas sinalizadoras em diversos tipos celulares. Como visto na figura 9, há diversas fontes de EROs e estas possuem várias implicações na transdução de sinal, contribuindo para a proliferação e diferenciação celular, migração e sobrevivência (115-117). Em células beta pancreáticas, EROs são consideradas importantes sinalizadoras para a GSIS (118, 119).

NADPH
NOXS

NADP+
O2

Mitochondria

NOXS

Peroxisome

Fe²+ or Cu⁺

H₂O₂

Cellular signaling (thiol oxidation)

Metabolic adaptation

Differentiation

Current Opinion In Cell Biology

Figura 9 – Fontes endógenas de EROs, sistema de defesa antioxidante e efeitos biológicos.

As EROs são produzidas pelo complexo enzimático NADPH oxidase (NOX), pela mitocôndria, pelo retículo endoplasmático e pelo peroxissomo. O superóxido citosólico é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da superóxido dismutase citosólica (SOD1). O peróxido de hidrogênio pode atuar como uma molécula sinalizadora por oxidar tióis de proteínas e regular inúmeros processos biológicos ou ser detoxificado em água pelas enzimas peroxirredoxinas (PRX), glutationa peroxidase (GPX) e catalase (CAT). Além disso, o peróxido de hidrogênio também pode sofrer reações e gerar o radical hidroxila, o qual causa danos oxidativos irreversíveis a lipídeos, proteínas e DNA. Fonte: Reczek CR et al., 2015 (115).

O H₂O₂ é reconhecidamente a principal ERO envolvida na sinalização redox (120) e suas ações intracelulares ocorrem principalmente pela oxidação de enxofre de grupos tiolato (S⁻) de moléculas-alvo, como proteínas, DNA e lipídeos, levando à formação de SO⁻. Tais modificações nas moléculas são reversíveis e alteram sua conformação e interatividade, contribuindo para seus efeitos biológicos. No entanto, devido à sua natureza reativa, concentrações suprafisiológicas de H₂O₂ podem levar a oxidação adicional a SO₂⁻ e SO₃⁻ de maneira irreversível, levando a alterações e danos permanentes em diversas moléculas. Diferentes espécies reativas também podem reagir entre si e formar outras espécies, como no caso do ONOO⁻, gerado a partir da reação entre NO⁺ e O₂⁺⁻. O ONOO⁻ é extremamente reativo, sendo um potente indutor de morte celular (121).

Os danos provocados por altos níveis de EROs ocorrem não apenas diretamente devido à oxidação de moléculas-alvo, mas também indiretamente por ativação de vias de

sinalização intracelulares, como NFκB, p38 MAPK e JNK, as quais, nessas condições, levam ao aumento da expressão de diversos genes relacionados ao dano celular e apoptose (122).

Por todos estes motivos, as espécies reativas estão envolvidas no envelhecimento e desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias e autoimunes, tais como aterosclerose, DM, degeneração neurológica, além de vários tipos de câncer (123, 124). Nosso organismo, em geral, é capaz de contrapor os possíveis danos oxidativos provocados por EROs e ERNs através de um sistema de defesa antioxidante presente nas células (figuras 9 e 10). Dentre as enzimas antioxidantes conhecidas, temos a responsável pela conversão de O_2 em H_2O_2 , chamada de superóxido dismutase (SOD), descoberta em 1969 por Irvin Fridovich (125). As três formas conhecidas da SOD são a citosólica, chamada de Cu-Zn-SOD1 ou SOD1, a presente na matriz mitocondrial chamada de Mn-SOD ou SOD2 e a extracelular chamada de Cu-Zn-SOD3 ou SOD3. O H_2O_2 pode ser eliminado pela ação de várias enzimas, como a catalase, a glutationa peroxidase, a tiorredoxina, a glutarredoxina e a peroxirredoxina (figura 10).

Em situações nas quais há elevada produção de EROs e ERNs e/ou os sistemas de defesa antioxidante não são capazes de contrapor essa produção, temos situações conhecidas como estresse oxidativo ou nitrosativo, relacionados com o desenvolvimento de inúmeras doenças.

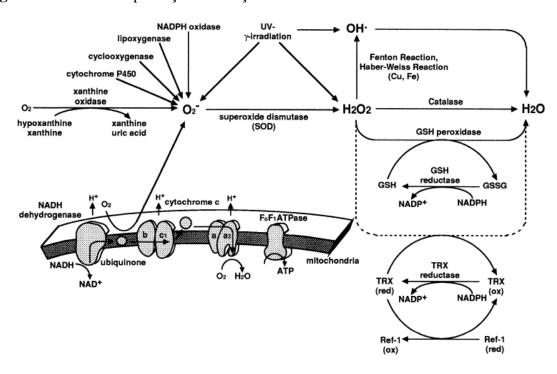


Figura 10 – Fontes de produção e remoção de EROs.

As diferentes fontes de superóxido incluem a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a NADPH oxidase, a lipoxigenase, a cicloxigenase, o citocromo P450 e a hipoxantina/xantina oxidase. O superóxido é convertido em H_2O_2 por ação da superóxido dismutase (SOD), e pode ser convertido ao radical hidroxila (OH) pela reação de Fenton ou por reações Haber-Weiss. O H_2O_2 é degradado por vários sistemas enzimáticos, como a catalase, a glutationa peroxidase e tiorredoxina.

Fonte: Kamata H. e Hirata H., 1999 (126).

Foi demonstrado que a atividade da Cu-Zn-SOD1 ou SOD1 é estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas de rato, sendo um possível mecanismo de prevenção de efeitos tóxicos provocados por altas concentrações de glicose (127). No entanto, em relação a outros tipos celulares de mamíferos, as células beta pancreáticas apresentam baixa expressão de enzimas clássicas responsáveis pela eliminação de H₂O₂, como catalase e glutationa peroxidase (128-130). Ao mesmo tempo em que este fato pode ser conveniente por possibilitar a utilização do H₂O₂ como segundo-mensageiro, também levanta a hipótese de que as células beta pancreáticas são particularmente sensíveis à elevação sustentada de EROs, tornando-as mais vulneráveis ao estresse oxidativo (128-131). Além da baixa expressão de enzimas clássicas antioxidantes, evidências indicam que os danos oxidativos ao DNA não são retificados de maneira eficaz pelas células beta (132). Portanto, em condições de ativação sustentada da produção de espécies reativas intracelulares, as ilhotas rapidamente entrariam em estresse oxidativo e falência (130).

Esta visão clássica de vulnerabilidade, no entanto, não parece plausível visto que essas células são altamente especializadas e permitem um eficaz acoplamento da fosforilação

oxidativa com a GSIS. Além disso, as células beta expressam isoformas de tiorredoxina, glutarredoxina e peroxirredoxina (133), e recentemente foi visto que as peroxirredoxinas/tiorredoxinas são importantes na eliminação de H₂O₂ na escala micromolar nessas células (134). Estes dados sugerem que as células beta não são tão sensíveis ao dano oxidativo, como pensado inicialmente.

Como a produção de algumas EROs é necessária para a sinalização celular e função biossintética e secretória normais, a célula beta deve orquestrar um balanço delicado na geração de EROs. Enquanto por um lado uma alta produção de EROs é destrutiva para a função e sobrevivência da célula beta, por outro lado um aumento transitório na geração de EROs é necessário como segundo-mensageiro para a GSIS (118, 119, 135). Assim, qualquer forma de desbalanço, seja ele relacionado ao excesso de produção (estresse oxidativo) ou ao excesso de remoção de EROs (estresse redutivo) pode ser prejudicial.

O consenso atual diz que nosso organismo necessita de pequenas quantidades de EROs e, portanto, ao invés de tentar sistematicamente reduzir EROs, seria mais efetivo definir alvos específicos de fontes de produção de EROs relevantes fisiopatologicamente. Apesar de recentes avanços nas ferramentas utilizadas para estudos da sinalização redox, os mecanismos envolvidos na maioria das respostas continuam muito pouco conhecidos. O pouco conhecimento deste mecanismo tão delicado poderia estar envolvido na ineficácia, nos efeitos deletérios e, até mesmo, na mortalidade após utilização de terapias com antioxidantes não específicos em ensaios clínicos (136-141).

1.6.2 Enzima NADPH oxidase

As EROs são normalmente produzidas como subprodutos. No entanto, as NADPH oxidases destacam-se como as únicas fontes que aparentemente apresentam como única função a produção de EROs.

As NADPH oxidases são complexos enzimáticos produtores de EROs e foram primeiramente descobertas em células fagocitárias, como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (142). As EROs produzidas são muito importantes na defesa do hospedeiro para eliminação de fungos e uma grande variedade de bactérias (110). Sua importância na clínica foi demonstrada na doença granulomatosa crônica, uma rara imunodeficiência bastante severa causada por mutações em genes que codificam subunidades da enzima, levando a risco de vida devido a infecções por bactérias e fungos (143, 144). Por volta dos anos 2000 descobriu-

se a expressão das NADPH oxidases em outros tecidos. Em 2003, nosso grupo mostrou a sua expressão em células beta pancreáticas de roedores (145) e em 2012 em células beta humanas (146).

O complexo proteico que forma as NADPH oxidases apresenta múltiplas subunidades, dentre as quais uma subunidade catalítica transmembrânica (NOX), além de várias proteínas estruturais e regulatórias localizadas no citosol e na membrana.

Em mamíferos, a NOX faz parte de uma família de proteínas que compreende sete isoformas: NOX1 a 5, com seis domínios transmembrânicos cada, e DUOX 1 e 2, com sete domínios transmembrânicos cada (147) (figura 11). Sabe-se que NOX1 a 3 necessitam do recrutamento adicional de subunidades citosólicas para a membrana e a montagem do complexo determina sua ativação, enquanto NOX4 parece estar constitutivamente ativa. A NOX5, DUOX1 e 2 possuem um domínio de ligação ao cálcio e não formam complexos multiproteicos para exercer sua função na membrana (147) (figura 11).

A NOX é ubiquamente expressa, porém as diversas isoformas são diferentemente expressas e reguladas de acordo com o tecido. As ilhotas pancreáticas humanas e de roedores expressam NOX1, NOX2 e NOX4 (145, 146, 148, 149). Adicionalmente, ilhotas humanas expressam a NOX5, ausente em ilhotas de roedores (150). Nosso grupo também detectou a expressão de DUOX1 e DUOX2 em ilhotas e linhagens de células beta de roedores (Almeida DC et al, dados ainda não publicados). Além disso, as diferentes isoformas possuem localizações intracelulares variáveis e, até mesmo, diferem nos seus produtos, tais como superóxido versus peróxido de hidrogênio (151). NOX1-3 e NOX5 parecem produzir principalmente superóxido, enquanto a NOX4 e DUOX1-2, principalmente peróxido de hidrogênio (151).

A localização intracelular das diferentes NOX depende do tipo celular e é um assunto que ainda precisa ser melhor explorado. Atualmente sabe-se que a NOX1 pode estar presente em cavéolas da membrana plasmática de células do músculo liso (152). A NOX2, em células fagocíticas está presente nos grânulos (153) e nas membranas plasmática e fagossomal (154), enquanto nas células musculares lisas, co-localiza-se com o citoesqueleto (155) e em neurônios encontra-se junto à membrana sináptica (156). A NOX4 é encontrada em adesões focais em células musculares lisas da vasculatura (152), na mitocôndria em células do córtex renal (157) e no retículo endoplasmático em células endoteliais (158). Em relação às células beta pancreáticas, sabe-se que a NOX2 é encontrada na membrana plasmática e em

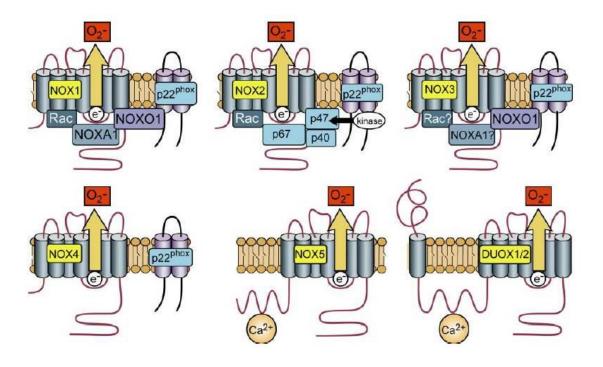
endossomos (159) e a NOX4 é encontrada na membrana nuclear (160). No entanto, não conhecemos a localização intracelular das isoformas NOX1 e 5.

O superóxido produzido por isoformas NOX presentes na membrana plasmática é liberado para o meio extracelular e pode ter dois destinos: entra na célula novamente através de canais para cloreto do tipo 3 (ClC3) ou é convertido em peróxido de hidrogênio no meio extracelular pela SOD3 e adentra a célula por meio de aquaporinas (161).

A primeira NADPH oxidase a ser descrita, a NOX2, foi inicialmente encontrada em células fagocitárias, sendo a mais conhecida até hoje. As subunidades localizadas na membrana são a NOX2 (ou gp91^{phox}), a qual consiste no núcleo catalítico da enzima, e a p22^{phox}. As subunidades NOX2 e p22^{phox} formam o flavocitocromo b558. As subunidades adicionais são necessárias para a regulação e ativação do complexo e estão localizadas no citosol no estado de repouso. Elas incluem as proteínas p67^{phox} (subunidade ativadora), p47^{phox} (subunidade organizadora) e p40^{phox} (subunidade reguladora, que auxilia a p67^{phox} como subunidade ativadora), assim como a pequena GTPase Rac 1 ou 2 (110) (figura 11).

A subunidade p22^{phox} parece ser um ligante geral para NOX1-4 na membrana. NOX1-2 também se ligam à GTPase Rac. Em contraste à NOX1-2, NOX4 é constitutivamente ativa e a modulação de sua expressão pode, portanto, ser o principal regulador da sua atividade.

Figura 11 – Esquema representativo de NOX1 a 5 e DUOX1 e 2.



Apesar de terem estrutura e função bastante semelhantes, as enzimas pertencentes à família das NADPH oxidases diferem em vários aspectos, inclusive no mecanismo de ativação. NOX1 requer p22^{phox}, NOX01 e NOXA1, além da GTPase Rac. NOX2 requer p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, Rac, além da fosforilação da subunidade p47^{phox}. A subunidade p40^{phox} não é indispensável, porém também se associa ao complexo e deve contribuir para sua ativação. NOX3 requer p22^{phox} e NOX01 e a ainda não há um consenso sobre a necessidade de Rac. NOX4 requer p22^{phox}, porém parece estar sempre em um estado constitutivamente ativo, sem a necessidade de subunidades adicionais para sua ativação. NOX5, DUOX1 e DUOX2 são ativados por Ca²⁺ e aparentemente não necessitam de mais subunidades para sua ativação.

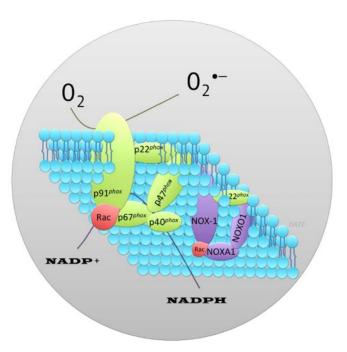
Fonte: Bedard K. e Krause KH., 2007 (162).

A existência de diferentes subunidades em diferentes compartimentos durante o estado de repouso (NOX2 ou gp91 phox e p22 phox na membrana e p47 phox, p40 phox, p67 phox e Rac no citosol) assegura que a enzima fique inativa. A ativação da NOX2 começa com a fosforilação da subunidade p47 phox pela PKC. A subunidade p47 phox interage com uma região rica em prolina presente na p22 phox. No entanto, a p47 phox possui uma região auto-inibitória, a qual previne a sua interação com a p22 phox até que haja fosforilação pela PKC. A fosforilação da p47 phox faz com que haja uma mudança conformacional, que induz a subsequente translocação de todo o complexo citosólico para a membrana. Dessa forma, a p47 phox interage com a p22 phox e a p67 phox e a Rac interagem entre si e com a NOX2. O complexo montado, agora ativo, produz ânions superóxido através da redução de uma molécula de oxigênio, utilizando como doador de elétrons predominantemente uma molécula de NADPH (110).

A NADPH oxidase NOX1 foi o primeiro homólogo de NOX2 descrito. Ela possui duas subunidades de membrana (NOX1 e p22^{phox}), sendo que a subunidade NOX1 apresenta aproximadamente 60% de homologia com a NOX2. Assim como a NOX2, a NOX1 também requer subunidades adicionais localizadas no citosol para montagem e ativação do complexo: NOXA1 (subunidade ativadora) e NOXO1 (subunidade organizadora), proteínas homólogas a p67^{phox} e p47^{phox}, respectivamente (163, 164) (figuras 11 e 12). Diferentemente da p47^{phox}, a qual é fosforilada e sofre uma mudança conformacional para ser ativada, a NOXO1 parece estar constitutivamente ativa (164).

Foi demonstrado que apesar da isoforma NOX2 interagir preferencialmente com p67^{phox} e p47^{phox} e NOX1 com NOXA1 e NOXO1, é possível que haja intercâmbio entre essas subunidades (164). Deste modo, diferentes tipos de regulação dessas NOX podem ser atingidas por diferentes combinações das subunidades organizadoras (p47^{phox} e NOXO1) com as subunidades ativadoras (p67^{phox} e NOXA1).

Figura 12 – Esquema representativo de NOX1 e NOX2, bem como as subunidades necessárias para sua ativação.



Do lado esquerdo, temos a isoforma mais estudada (NOX2). O núcleo catalítico da enzima é a subunidade gp91^{phox} ou NOX2. A proteína de membrana p22^{phox} estabiliza o núcleo catalítico, facilitando o recrutamento das subunidades citosólicas (p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}) e a GTPase Rac. O superóxido é gerado através da redução de um elétron do oxigênio pelo NADPH. Do lado direito, temos outra isoforma formada pelo homólogo da gp91^{phox} conhecido como NOX1, o qual interage com homólogos da p47^{phox} e p67^{phox}, chamados NOXO1 (Proteína Organizadora de NOX1) e NOXA1 (Proteína Ativadora de NOX1), respectivamente. Fonte: Taylor-Fishwick DA., 2013 (165).

Como citado anteriormente, nosso grupo foi o primeiro a mostrar a expressão gênica (gp91^{phox}, p22^{phox} e p47^{phox}) e proteica (p47^{phox} e p67^{phox}) das subunidades da NOX2 em ilhotas pancreáticas de rato (145). Outro estudo mostrou que as ilhotas de rato também expressam a NOX1, NOX4, p40^{phox}, NOXA1 e NOXO1 (148). Posteriormente, nosso grupo mostrou a expressão gênica (p22^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}) e proteica (p47^{phox} e p67^{phox}) da NOX2 em ilhotas humanas, além da co-localização de p47^{phox}, p67^{phox} e gp91^{phox} com células positivas para insulina (146).

1.6.3 Enzima NADPH oxidase na fisiopatologia da célula beta pancreática

A inibição farmacológica da NOX com um inibidor não específico (DPI) provocou diminuição da produção de superóxido (145) e peróxido de hidrogênio (119) em ilhotas isoladas. A inibição da NOX com DPI ou oligonucleotídeo antisense para uma de suas subunidades (p47^{phox}) provocou redução da GSIS em ilhotas (119), e a inibição da NOX com siRNA contra outra de suas subunidades (Rac1) também levou à diminuição da GSIS em células beta INS 832/13 (166). Estes resultados mostram a participação da NOX no processo fisiológico de secreção de insulina. Além disso, a inibição da NOX com DPI inibiu o aumento de superóxido e de secreção de insulina estimulados pelo ácido palmítico em ilhotas de rato (167).

Ao mesmo tempo em que apresenta um importante papel na fisiologia das células beta, a atividade sustentada da NOX pode contribuir para a disfunção dessas células associada ao desenvolvimento e progressão de DM (165), com implicação significativa no início da disfunção metabólica sob condições de estresse (168, 169). Além de sua implicação no DM (170), diferentes isoformas da NOX foram implicadas na patogênese de uma grande variedade de doenças como: câncer (171), hipertensão (172, 173), fibrose pulmonar (174), doença renal (175) e doenças neurodegenerativas (162), entre outras.

O envolvimento da NOX na disfunção e morte de células beta tem sido estudado em condições que mimetizam o DM1 e DM2, como a exposição a citocinas pró-inflamatórias e a altas concentrações de glicose e AGs saturados, respectivamente. Nosso laboratório verificou que 1 hora de exposição de ilhotas pancreáticas de rato a uma combinação de citocinas (TNF, IL-1β e IFN-γ) ou ao ácido palmítico provoca aumento da expressão proteica de uma subunidade da NOX (p47^{phox}) e que a exposição à IL-1β ou ao ácido palmítico leva ao aumento do conteúdo de superóxido via NOX, visto que este efeito foi revertido pela inibição

da NOX com DPI ou oligonucleotídeo antisense para p47^{phox} (176). Utilizando outro inibidor não específico da NOX (apocinina) (177), outro grupo mostrou a participação da enzima na disfunção da secreção de insulina provocada por 24 horas de exposição à mesma combinação de citocinas ou ao ácido palmítico na linhagem de células beta BRIN-BD11 e em ilhotas pancreáticas de camundongo (178). Além disso, recentemente mostramos uma relação entre a ativação da NOX e de um receptor de AGs ativado pelo ácido palmítico (GPR40) na linhagem BRIN-BD11 (179).

O desenvolvimento e a utilização de inibidores seletivos à NOX e isoformaespecíficos evidenciaram ainda mais o envolvimento da NOX na disfunção das células beta em condições que mimetizam o DM. Neste sentido, o desenvolvimento de diabetes espontâneo em camundongos NOD, um modelo de DM1, foi prevenido pela inibição de uma das subunidades da NOX (Rac1) pelo inibidor NSC23766 (180). Além disso, foi mostrado o envolvimento da NOX na desregulação mitocondrial associada à exposição às citocinas próinflamatórias em células beta INS 832/13 (181).

Utilizando um inibidor de NOX1/4 (ML171), Weaver JR e colaboradores mostraram o papel de NOX1/4 na geração de EROs, ativação de caspase 3 e disfunção secretória em diferentes modelos de células beta expostas às citocinas pró-inflamatórias (182, 183). Em outro estudo, foi evidenciado o papel de NOX2 na lipotoxicidade em células beta NIT-1, visto que a utilização de siRNA contra NOX2 protegeu contra a disfunção e apoptose induzidas por ácido palmítico (184). O papel de NOX4 também foi evidenciado na intolerância à glicose induzida por dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6 pela utilização do inibidor seletivo NOX4, GLX351322 (149). Por fim, um estudo utilizou três inibidores isoforma-específicos, a fim de avaliar o impacto das isoformas NOX1 (ML171), NOX2 (Phox-I2) e NOX4 (GLX7013114) na disfunção de ilhotas humanas e da linhagem de célula beta humana EndoC-βH1 frente a exposição às citocinas ou a alta glicose + ácido palmítico (160). Eles mostraram que a NOX1 não possui papel em nenhum dos dois casos, enquanto a NOX2 participa apenas da glicolipotoxidade e a NOX4 possui papel em ambos os estresses (160).

Portanto, todas as evidências indicam que a inibição da atividade da NOX pode representar um alvo para a preservação da função da célula beta durante o desenvolvimento de DM1 e DM2. Estudos mais antigos com inibidores sem especificidade à enzima ou às suas diferentes isoformas, como DPI e apocinina, forneceram pistas sobre a função fisiopatológica da NOX. Além disso, o desenvolvimento de vários inibidores mais específicos e seletivos às diferentes isoformas trouxeram resultados interessantes nos últimos anos (185-187). Porém,

apesar dos estudos utilizando inibidores isoforma-específicos terem trazido uma grande contribuição, eles ainda são escassos e apresentam muitas diferenças, como o tipo de inibidor e o tipo celular. Isso faz com que diferentes grupos apostem na inibição de isoformas diferentes e ainda não é possível afirmar se uma isoforma em particular possui maior relevância.

A meia-vida biológica das espécies reativas costuma ser breve (114). Mesmo no caso do H₂O₂ que possui meia-vida maior dentre as EROs e é capaz de atravessar membranas livremente, é baixa sua probabilidade de percorrer grandes distâncias, já que o citosol é repleto de enzimas especializadas em sua eliminação (115, 126). Dessa forma, as espécies reativas devem ser relevantes, sobretudo, em locais próximos à sua produção. Além do pouco conhecimento sobre a localização da produção de EROs e a relevância de cada isoforma NOX, muito pouco se sabe sobre a relação temporal entre os acontecimentos intracelulares que são desencadeados e culminam com a disfunção e morte das células beta. Sabe-se que a produção de EROs em um compartimento pode induzir um mecanismo de *feedback* positivo, levando à formação de EROs em outro compartimento, numa situação denominada produção de EROs induzida por EROs (*ROS-induced ROS-release* - RIRR). Por isso, técnicas que avaliem a dinâmica de produção dessas espécies podem nos ajudar a desvendar a sequência de mecanismos desencadeados, fornecendo pistas para criar estratégias de modulação dos processos.

2 JUSTIFICATIVA

Os dois principais tipos de DM apresentam etiologias distintas, porém um desfecho clínico comum, a hiperglicemia. O DM1 é caracterizado por absoluta deficiência de insulina por uma destruição massiva de células beta, devido ao ataque autoimune e inflamação local nas ilhotas (insulite). O DM2 é caracterizado por disfunção secretória progressiva associada a graus variados de resistência à ação periférica da insulina, normalmente no contexto de obesidade. As citocinas liberadas localmente no DM1 e a glicolipotoxicidade no DM2 modulam a atividade de vários processos destrutivos em comum, como os estresses de RE e oxidativo, provocando prejuízo da função e morte das células beta pancreáticas. Ambos os estresses são processos biológicos altamente interconectados e, portanto, terapias que tenham ambos como alvo podem ser bastante efetivas para tratar ou prevenir o DM.

Dentre as diversas fontes de EROs, as NADPH oxidases (NOXs) destacam-se como as únicas que produzem EROs como função principal. Elas são complexos enzimáticos multiproteicos produtores de superóxido e peróxido de hidrogênio presentes na célula beta pancreática. Apesar das EROs serem importantes sinalizadoras para a fisiologia da GSIS, elas também estão envolvidas no desenvolvimento de DM. Neste sentido, evidências indicam o envolvimento de isoformas da NOX com os estresses de RE e oxidativo em situações que mimetizam o DM1 e o DM2. Porém, como as EROs são produzidas e rapidamente eliminadas, é de extrema importância o conhecimento sobre o local de sua produção, bem como a temporalidade da produção, a fim de se desenvolver estratégias de manejo precoce para evitar o completo estabelecimento do DM1 e DM2.

Nossa hipótese é de que as citocinas pró-inflamatórias e o ácido palmítico induzem a produção de EROs via NADPH oxidases em células beta pancreáticas, impactando na secreção de insulina e sobrevivência da célula beta pancreática, que pode ou não envolver o estresse de RE, tendo grande relevância no desenvolvimento de DM1 e DM2.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento de isoformas da enzima NADPH oxidase na disfunção e morte de células beta pancreáticas expostas a condições que mimetizam o DM1 (combinação de citocinas pró-inflamatórias) e o DM2 (ácido palmítico).

3.2 Objetivos específicos

Destacamos aqui três pontos importantes: i) a localização da produção primária de EROs (mitocôndria versus citosol) em ilhotas expostas às citocinas pró-inflamatórias ou ao ácido palmítico, ii) o envolvimento de NOX e suas isoformas na disfunção e perda de viabilidade das ilhotas frente à exposição às citocinas pró-inflamatórias ou ao ácido palmítico e iii) os efeitos *in vivo* da ausência de NOX no pâncreas e nas células beta pancreáticas.

Em relação ao DM1, utilizamos uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β + TNF + IFN-γ) para expor ilhotas de camundongos C57BL/6J *wild type* (WT) ou knockout (KO) para NOX1 ou NOX2. Em seguida, avaliamos:

- a) A importância do citosol versus mitocôndria nos níveis de EROs e de NAD(P)H;
- b) O efeito da ausência de NOX1 ou NOX2 nos seguintes parâmetros: produção de superóxido e H₂O₂, homeostase da glicose, resistência à insulina, função secretória, homeostase de cálcio, estresse de RE e viabilidade celular;
- c) A viabilidade celular após tratamento com inibidor NOX1/4 (ML171) e a expressão gênica de isoformas NOX e do fator de transcrição PDX-1 após silenciamento da NOX2, em linhagem de células beta INS-1E;
- d) O efeito da ausência de NOX1 ou NOX2 na indução de DM1 em modelo animal nos seguintes parâmetros: área e circularidade das ilhotas, marcação de insulina, marcação de proliferação, marcação de diferenciação e marcação de inflamação.

Em relação ao DM2, utilizamos o ácido graxo saturado ácido palmítico para expor ilhotas de camundongos C57BL/6J WT ou NOX2 KO. Em seguida, avaliamos:

- a) A importância do citosol versus mitocôndria nos níveis de EROs e de NAD(P)H;
- b) O efeito da ausência de NOX2 nos seguintes parâmetros: produção de H₂O₂, função secretória, homeostase de cálcio e viabilidade celular;
- c) O estresse de RE após exposição ao ácido palmítico na ausência ou presença do inibidor da NOX VAS2870, em linhagem de células beta BRIN-BD11.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura das linhagens de célula beta INS-1E e BRIN-BD11

As células de insulinoma de rato INS-1E foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Claes B. Wollheim e Prof. Dr. Pierre Maechler (Universidade de Genebra, Suíça). As células INS-1E foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 10 mM HEPES, 100 U/ml penicilina, 100 μg/ml estreptomicina, 1 mM piruvato de sódio e 50 μM 2-mercaptoetanol em 11,1 mM de glicose em pH 7,4. As células BRIN-BD11 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de SFB (v/v), 100 U/ml penicilina, 100 μg/ml estreptomicina e 11,1 mM de glicose em pH 7,4. Todas as células foram mantidas em incubadora (Nuaire, Plymouth, MA, Estados Unidos) a 37 °C em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂), em 10-15 ml de meio de cultura em frascos para cultura estéreis.

4.2 Tratamento das linhagens de célula beta INS-1E e BRIN-BD11

As células INS-1E foram cultivadas por no mínimo 48 horas antes da exposição às citocinas pró-inflamatórias (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) e então mantidas por diferentes períodos, conforme indicado, para análise de viabilidade celular na ausência ou presença de ML171 (1 ou 10 μ M) e expressão gênica após silenciamento de NOX2. As células BRIN-BD11 foram cultivadas *overnight* antes da exposição a 100 μ M de ácido palmítico na ausência ou presença de 10 μ M de VAS2870 para análise do estresse de RE.

4.3 Modelos animais

Para avaliação da produção de H₂O₂, foram utilizadas duas linhagens de camundongos C57BL/6 geneticamente modificados, recentemente gerados por Roma e colaboradores (188). Ambos expressam o sensor redox Orp1, sensível a H₂O₂, associado à proteína verde fluorescente (roGFP2), de maneira constitutiva em todos os seus tecidos. Uma das linhagens de camundongos transgênicos expressa o sensor roGFP2-Orp1 somente na matriz mitocondrial (C57BL/6N / Mito-roGFP2-Orp1) e a outra expressa o sensor no citosol/núcleo

(C57BL/6J / roGFP2-Orp1) (188, 189). Dessa forma, podemos avaliar a produção de H₂O₂, de acordo com o estímulo, em cada ilhota em tempo real e com resolução de compartimento (mitocôndria versus citosol/núcleo).

A fim de avaliar a relevância de NOX2 na produção de H₂O₂, fizemos o cruzamento de camundongos machos roGFP2-Orp1 (que expressam o sensor no citosol/núcleo) com camundongos fêmeas NOX2 KO, a fim de obter camundongos NOX2 KO com o sensor roGFP2-Orp1 no citosol/núcleo. Como o NOX2 é ligado ao cromossomo X, nós utilizamos apenas os machos da prole (hemizigotos) e confirmamos o *knockout* por genotipagem (Apêndice A - figura 1A). Como a nova linhagem obtida é heterozigota para o sensor, também cruzamos camundongos roGFP2-Orp1 com camundongos C57BL/6J sem o sensor, para termos controles heterozigotos apropriados.

Nos demais experimentos, foram utilizados camundongos controle C57BL/6J *wild type* (WT), NOX1 KO (identificação no *GenBank*: 114243) e NOX2 KO (identificação no *GenBank*: 66021) machos. Os animais foram utilizados com aproximadamente 60 a 90 dias de vida e foram mantidos nos biotérios do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil) ou do Centro de Fisiologia Integrativa e Medicina Molecular (*Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine*: CIPMM) da Universidade de Saarland (Homburg, Alemanha). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro por gaiola) à temperatura de 23 ± 2°C sob ciclo iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal locais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP (Protocolos CEUA nº 62/2016 e 66/2015) e normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.4 Análise da composição corporal

Os animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO foram imobilizados e analisados quanto à composição corporal (porcentagem de gordura, massa magra e fluidos corporais) em aparelho de ressonância magnética nuclear Minispec LF50 mq7,5 (Bruker Corporation, MA, EUA), sem necessidade de anestesia prévia.

4.5 Homeostase glicêmica

4.5.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Para o GTT, os grupos WT, NOX1 KO e NOX2 KO foram submetidos a jejum noturno de 10 a 12 horas. Em seguida, a primeira coleta de sangue foi feita por meio de punção na extremidade caudal do animal (tempo 0) e a glicemia foi mensurada em glicosímetro OneTouch Ultra (LifeScan, Inc. Johnson & Johnson, CA, EUA). Em seguida, uma solução de glicose em solução salina, constituindo a dose 1 g glicose / kg de peso corporal, foi administrada aos animais através de injeções intraperitoneais. A seguir, a glicemia das amostras de sangue foi mensurada após 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos.

4.5.2 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Para o ITT, os grupos WT, NOX1 KO e NOX2 KO foram submetidos à restrição alimentar de 4 horas. Em seguida, a primeira coleta de sangue foi feita por meio de punção na extremidade caudal do animal (tempo 0) e a glicemia foi mensurada em glicosímetro OneTouch Ultra (LifeScan, Inc. Johnson & Johnson, CA, EUA). Em seguida, uma solução de insulina humana regular (Humulin, Indianápolis, IN, EUA) em solução salina na dose de 0,75 UI / kg de peso corporal, foi administrada aos animais por injeções intraperitoneais. Então, a glicemia das amostras de sangue foi mensurada após 5, 10, 15, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos.

4.6 Isolamento e dispersão de ilhotas pancreáticas

Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e posteriormente decapitados. O pâncreas foi retirado e mantido em solução de Hanks com colagenase. As ilhotas foram separadas manualmente com auxílio de lupa e mantidas em placas para cultura estéreis em meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 10 mM de glicose, 10% de SFB, 100 U/ml penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina, em atmosfera de 5% CO₂, a 37 °C. As ilhotas foram expostas ao mix de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β + TNF + IFN-γ) ou ao ácido palmítico (100 μM) por 24 horas ou 48 horas para análise de produção de superóxido e H₂O₂, análise dos níveis de NAD(P)H, secreção de insulina, homeostase de cálcio, avaliação de proteínas do estresse de RE e viabilidade celular. Especificamente para

análise em tempo real dos níveis de H_2O_2 e NAD(P)H em camundongos com o sensor roGFP2-Orp1, utilizamos três combinações das citocinas: Mix 1 (60 U/ml IL-1 β + 185 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ), Mix 2 (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) ou Mix 3 (50 U/ml IL-1 β + 50 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ). Em todos os demais experimentos, utilizamos o Mix 2 (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ). Nos estudos de citometria de fluxo (viabilidade por kit Via Count e pelo *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI* e produção de superóxido por DHE), as células das ilhotas foram dispersas previamente com tripsina, já que o diâmetro da ilhota íntegra ultrapassa o limite da célula de fluxo do citômetro.

4.7 Avaliação de Espécies Reativas e NAD(P)H

4.7.1 Avaliação da produção de superóxido com DHE

Utilizou-se ilhotas isoladas de camundongos WT, NOX1 KO e NOX2 KO para avaliar a produção de superóxido após a incubação com citocinas pró-inflamatórias por diferentes períodos. Após a exposição, grupos de 30 ilhotas foram incubados em 500 μl de tampão Krebs Henseleit (KH) com 50 μM da sonda DHE por 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as ilhotas incubadas com 300 μl de tripsina por 2 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada com 1 ml de meio RPMI completo. As ilhotas foram centrifugadas (1000 rpm, 1 min) e o sobrenadante descartado. As ilhotas foram ressuspensas em 200 μl de meio RPMI completo e as células foram dispersas por pipetagem *up and down*. A suspensão de células foi transferida para placa de 96 poços e a fluorescência foi captada pelo citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Millipore). Os valores de cada experimento foram normalizados pelo respectivo controle, considerado como 1.

4.7.2 Avaliação da produção de H_2O_2 mitocondrial ou citosólico/nuclear e de NAD(P)H em ilhotas roGFP2-Orp1

Utilizou-se ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos mito-roGFP2-Orp1 e ro-GFP2-Orp1 para determinar os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e NAD(P)H após a exposição às citocinas pró-inflamatórias ou ao ácido palmítico, em tempo real durante 24 horas em leitor de microplaca CLARIOstar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). A

temperatura interna foi ajustada para 37°C e as condições atmosféricas ajustadas para 5% de CO₂, com a ventilação aberta para difusão livre de O₂ no sistema (concentração de O₂ no sistema foi de 18,6%). Esta nova metodologia nos permite rastrear rapidamente o impacto de múltiplos tratamentos diferentes e o tempo de tratamento nas alterações específicas dos compartimentos intracelulares nos níveis de H₂O₂ e NAD(P)H. Grupos de 25 ilhotas foram transferidos para placas de 96 poços com fundo redondo contendo 100 µl de meio RPMI sem fenol e sem tratamento. Em seguida, adicionamos em cada poço 100 µl de meio RPMI suplementado com as diferentes condições duas vezes concentradas. O volume final de cada poço foi 200 µl. A leitura de fluorescência foi feita a cada 10 minutos durante 24 horas consecutivas. Como observado na figura 13, o domínio Orp1 facilita a oxidação do roGFP2 na presença de H₂O₂. Os níveis de H₂O₂ mitocondrial ou citosólico/nuclear foram determinados por excitação em 405 nm e 488 nm, pois correspondem à medida de roGFP2 oxidado e roGFP2 reduzido, respectivamente. Os níveis de NAD(P)H foram determinados através de sua autofluorescência por excitação em 340 nm. A fluorescência basal emitida por ilhotas WT (que não expressam o sensor) foi subtraída dos poços contendo Mito-roGFP2-Orp1 e roGFP2-Orp1. Calculamos a razão 405/488 nm, a qual representa o valor do roGFP2 oxidado (405 nm) dividido pelo valor do roGFP2 reduzido (488 nm), e o grau de oxidação (OxD_{roGFP2}), o qual leva em consideração os controles totalmente oxidados e totalmente reduzidos e, dessa forma, permite uma melhor comparação entre amostras. Os valores de OxD_{roGFP2} foram obtidos por poços com ilhotas tratadas com ditiotreitol (DTT) ou diamida, respectivamente agentes redutores e oxidantes, e foi calculado conforme a Equação (1), como descrito anteriormente (190). O cálculo da razão e do OxD_{roGFP2} foi uma forma de confirmar o efeito observado de duas maneiras e garantir que não fosse resultado de nenhum artefato.

Figura 13 – Mecanismo de detecção de H₂O₂ pelo sensor roGFP2-Orp1.

$$H_2O_2$$
 OH S^- SH SH SH H_2O S—S SH SH SH SH S—S Orp1 — GFP \longrightarrow Orp1 — GFP \longrightarrow Orp1 — GFP

O sensor Orp1 possui dois grupos derivados de enxofre, um tiol (SH) e um tiolato (S $^{\circ}$). O grupo nucleofílico S° presente no Orp1 ataca o H_2O_2 , levando à formação de S-OH, o qual, por sua vez, reage com o tiol presente no Orp1, formando uma ponte dissulfeto. Como o GFP apresenta dois grupos tiol, a ponte dissulfeto é transferida entre o Orp1 e orp1

Fonte: modificado de Morgan B et al., 2011 (190).

Equação (1) utilizada para cálculo do OxD_{roGFP2}:

$$OxD_{roGFP2} = \frac{(I405 \times I488_{red}) - (I405_{red} \times I488)}{(I405 \times I488_{red}) - (I405 \times I488_{ox}) + (I405_{ox} \times I488) - (I405_{red} \times I488)}$$

Sendo:

*I*405 = amostra em 405 nm / *I*488 = amostra em 488 nm

 $\it I405_{\rm red}$ = controle com DTT em 405 nm / $\it I488_{\rm red}$ = controle com DTT em 488 nm

 $I405_{ox}$ = controle com diamida em 405 nm / $I488_{ox}$ = controle com diamida em 488 nm

4.7.3 Avaliação da produção de H₂O₂ em ilhotas NOX2 KO:roGFP2-Orp1

A fim de investigar a participação da NOX2 na produção de H₂O₂, utilizamos ilhotas de camundongos NOX2 KO:roGFP2-Orp1 e seu respectivo controle heterozigoto apropriado, obtidos conforme descrito no item 4.3. Inicialmente, tentamos fazer a leitura da fluorescência das ilhotas no mesmo leitor de microplacas. No entanto, como as ilhotas são heterozigotas para o sensor, a fluorescência total não era suficiente para este tipo de metodologia. Portanto, a fluorescência das ilhotas expostas ao ácido palmítico foi analisada no microscópio de fluorescência Axio Observer 7 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) em tempo real. Além disso, também utilizamos a metodologia de histologia redox. Para isso, coletamos as ilhotas e incubamos pelo período correspondente ao pico de produção de H₂O₂: 4h30 min com a combinação de citocinas pró-inflamatórias ou por 5 horas com o ácido palmítico. Após o período de incubação, tratamos as ilhotas com N-etil-maleimida (NEM), um agente alquilante de tiol irreversível, para fixação química do sensor, seguido de paraformaldeído (PFA) a 4% para fixação do tecido. As ilhotas foram incluídas em parafina e os blocos foram seccionados. Todas as ilhotas presentes em cada lâmina foram fotografadas no microscópio Axio Observer 7 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com a objetiva de 63x e analisadas e quantificadas no programa ImageJ Fiji.

4.8 Secreção estática de insulina

Após o período de incubação com o mix de citocinas ou com o ácido palmítico, as ilhotas foram submetidas à incubação com duas concentrações de glicose: 5,6 ou 16,7 mM, a fim de se verificar a secreção estática de insulina. Para tanto, foram pré-incubadas, sob

agitação, em 500 μl de tampão Krebs Henseleit (KH) em 2,8 mM de glicose por 30 minutos a 37 °C. O sobrenadante foi então removido e as ilhotas incubadas, sob agitação, em 500 μl de KH com 5,6 ou 16,7 mM de glicose por 1 hora a 37 °C. Esse sobrenadante foi coletado e estocado a -20 °C para posterior dosagem de insulina. As ilhotas foram então lisadas em 500 μl de uma solução de álcool-ácido (52 ml etanol, 17 ml água, 1 ml ácido clorídrico) para provocar o rompimento das células para dosagem do conteúdo intracelular de insulina.

4.9 Dosagem de insulina

A quantidade de insulina secretada e o conteúdo intracelular de insulina dos animais WT e NOX2 KO foi determinada por Transferência Ressonante de Energia por Fluorescência (FRET) utilizando o kit *Insulin Ultra-Sensitive Assay Kit* (Cisbio, Codolet, França). Utilizaram-se dois anticorpos anti-insulina (um doador e outro aceptor); ambos ligam-se à insulina presente na amostra e ficam em uma proximidade suficiente para permitir a transferência de energia da molécula doadora para a aceptora. A molécula aceptora torna-se excitada e subsequentemente produz a emissão de fluorescência em um comprimento de onda específico, perdendo energia retornando para seu estado fundamental. A luz emitida foi detectada em leitor de placa de fluorescência CLARIOstar (BMG Labtech).

4.10 Avaliação da homeostase de cálcio

Após o período de incubação com o mix de citocinas ou o ácido palmítico, as ilhotas foram avaliadas quanto à dinâmica de cálcio. Para tanto, foram expostas a 5 μM da sonda Fura-2 AM por 2 horas a 37°C e, posteriormente, os níveis de cálcio foram acompanhados pelo microscópio de fluorescência Axio Observer 7 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Avaliamos tanto os níveis de cálcio total, como o mecanismo de entrada de cálcio operada por estoque (*Store-Operated Calcium Entry*: SOCE), como descrito anteriormente (191). As medidas foram feitas a cada 2 segundos por 20 minutos. Para avaliação de cálcio total, o protocolo foi dividido em duas partes: primeiro em tampão sem glicose, seguido de adição de alta glicose (20 mM). Para avaliação do mecanismo SOCE, o protocolo foi dividido em três partes: primeiros cinco minutos em tampão sem glicose e sem cálcio. Após sete minutos, uma solução de tapsigargina no mesmo tampão foi adicionada (concentração final: 3 μM) para esvaziar os estoques de cálcio do RE. Finalmente, adicionamos 3 μM de tapsigargina + 2 mM

cálcio para analisar o mecanismo SOCE. Durante todo o experimento, não houve glicose no meio para evitar a ativação dos canais para cálcio dependentes de voltagem. As medidas foram feitas usando excitação em 340/380 nm e emissão em 505 nm.

4.11 Avaliação da expressão proteica por western blot

Após o período de incubação com o mix de citocinas ou o ácido palmítico, foi feita a lise celular utilizando o tampão de amostra Laemmli. As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida seguida de transferência para membrana de nitrocelulose (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de 5% de leite desnatado em *Tris-Buffered Saline Tween* (TBST) por uma hora, à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários de proteínas de interesse listadas na tabela 1. Em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Alemanha) por 2h30min, à temperatura ambiente. Finalmente as membranas foram reveladas com o uso do reagente *Enhanced Chimiluminescence* (ECL) e as imagens foram capturadas pelo aparelho Image Quant LAS4000 (GE Healthcare, Oslo, Noruega). A análise quantitativa das bandas foi feita por densitometria com o auxílio do programa do próprio aparelho.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para análise da expressão proteica.

Anticorpo Primário	Fabricante	Referência	Concentração
IRE1 fosforilado	Millipore	MABC742	1:500
α-tubulina	Millipore	05-829	1:2000
eIF2α fosforilado	Cell Signaling	9721S	1:1000
XBP1s	Cell Signaling	83418	1:1000
BiP	Cell Signaling	3183	1:1000
СНОР	Cell Signaling	2895S	1:1000
Caspase 3 clivada	Cell Signaling	9662S	1:1000

4.12 Viabilidade celular e apoptose

Após o período de incubação com o mix de citocinas ou com o ácido palmítico, as células e ilhotas foram avaliadas quanto à viabilidade celular e apoptose por pelo menos dois dos quatro métodos a seguir.

4.12.1 Kit Via Count (Millipore, Billerica, MA, EUA)

O kit Via Count possui diferentes corantes que possibilitam a diferenciação entre células viáveis, mortas e em apoptose. As ilhotas foram previamente dispersas com tripsina e o kit foi utilizado conforme instruções do fabricante. Células e ilhotas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI e incubadas com o kit ViaCount por 5 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, a análise de fluorescência foi feita por citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Millipore).

4.12.2 Marcação com iodeto de propídeo com FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (BioLegend, California, EUA)

O kit utiliza dois corantes: anexina V, a qual detecta células em apoptose, e o iodeto de propídeo (PI), que detecta células necróticas e em estágios finais de apoptose. O kit foi utilizado conforme instruções do fabricante. Grupos de 30 ilhotas foram previamente dispersas com tripsina e ressuspendidas em 200 µl do *Annexin V Binding Buffer*. A suspensão recebeu 5 µl de anexina V e 10 µl de PI e foi incubada por 15 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram centrifugadas para remover o sobrenadante e ressuspendidas em 100 µl de *Annexin V Binding buffer*. A análise de fluorescência foi feita por citometria de fluxo.

4.12.3 Fragmentação de DNA com Cell Death Detection ELISA^{plus} kit (Sigma Aldrich, Missouri, EUA)

Grupos de 50 ilhotas foram coletados com 200 µl de meio de cultura e centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as ilhotas lisadas com *Lysis Buffer* por 30 minutos à temperatura ambiente e depois centrifugadas a

1400 rpm por 10 minutos. Um volume de 20 μl do sobrenadante foi transferido para a placa de ELISA em duplicatas, juntamente com 80 μl de *Incubation Buffer*. Um controle negativo foi feito com meio de cultura fresco e um controle positivo foi fornecido pelo próprio kit. As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. O conteúdo dos poços foi descartado e cada poço foi lavado três vezes com *Incubation Buffer*. Os poços foram então incubados com solução ABTS por 20 minutos antes da adição de ABTS *Stop Solution*. A absorbância foi medida em 405 nm no leitor de placa de fluorescência CLARIOstar (BMG Labtech).

4.12.4 Expressão proteica de caspase 3 clivada

A expressão proteica da porção clivada da caspase 3 foi avaliada por western blot, de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

4.13 Silenciamento de NOX2 pelo uso de siRNA

O silenciamento de NOX2 foi feito em células INS-1E pelo uso de siRNA específico contra NOX2 (identificação no *GenBank*: NM_023965.1, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) de *R. norvegicus*. Utilizou-se um siRNA não específico (siRNA controle), ou seja, que não apresenta homologia a qualquer gene conhecido em ratos, como controle negativo. Para transfecção utilizou-se Lipofectamina (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram mantidas a 37°C em meio RPMI 1640 com Lipofectamina e 11,1 mM de glicose na presença do siRNA contra NOX2 (siNOX2) ou do siRNA controle (siCT) por 12 a 16 horas. Após o período de transfecção, o meio foi substituído por meio RPMI 1640 novo e as células mantidas em atmosfera de 5% CO₂, a 37 °C por 48 horas adicionais até a realização dos experimentos.

4.14 Avaliação de mRNA por RT-PCR em tempo real

Após a transfecção com siRNA e incubação com o mix de citocinas, a extração do RNA total foi feita utilizando o reagente Trizol, de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, uma amostra de 3 μg de cada RNA foi submetida à reação de transcrição reversa para geração do cDNA e o produto da reação foi utilizado na reação de RT-PCR em

tempo real utilizando o equipamento Rotor-Gene 6000 e o SYBR GREEN como sonda fluorescente. Foram utilizados *primers* específicos designados para avaliação da expressão dos genes e a expressão de GAPDH foi determinada em paralelo como gene controle. Os resultados foram analisados pelo programa Rotor-Gene 6000 Series Software e a análise das variações da expressão gênica foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (192).

Tabela 2 – *Primers* utilizados na reação de RT-PCR em tempo real.

Primer	Sequência		
NOX1	sense: ATGAGTGAAAGTCATCCCCGC antisense: ACTTCCAAGACTCAGGGGGTT		
NOX2	sense: TGCCCAGTACCAAAGTTTGCC antisense: GACCCACGATCCATTTCCAAG		
NOX4	sense: TTGGCTGTCCCTAAATGTCCTG antisense: AAACACAATCCTAGGCCCAAC		
PDX-1	sense: CGGACATCTCCCCATACG antisense: AAAGGGAGATGAACGCGG		
GAPDH	sense: GTCGGTGTCAACGGATTTGG antisense: CGTGGGTAGAATCATACTGGAACAT		

4.15 Indução de DM1 por MLDZ

A indução de DM1 foi feita através do protocolo de doses baixas e múltiplas de estreptozotocina (MLDZ). Foram feitas injeções intraperitoneais de STZ (Sigma) em tampão citrato na dose 50 mg/kg peso corporal por cinco dias consecutivos. A solução de STZ em tampão citrato pH 4,5 foi preparada todos os dias. Por cinco dias consecutivos, os animais foram mantidos em restrição alimentar de 1h30min antes e depois da injeção. A glicemia com 4 horas de restrição alimentar foi mensurada no primeiro dia após o término das injeções e sucessivamente em dias alternados até a confirmação do diabetes. Foram necessárias três

medidas consecutivas de glicemia acima de 200 mg/dl para confirmação do diabetes. Após a confirmação, os animais foram submetidos ao teste GTT e os pâncreas foram retirados para histologia e imunomarcação.

4.16 Coleta do pâncreas e inclusão do tecido em parafina

Após a eutanásia dos animais, o pâncreas inteiro foi coletado e imerso em paraformaldeído 4% (pH 7,4 a 4 °C) durante 24 horas. Após esse período, o tecido foi desidratado em banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes (70, 80, 95 e 100%), diafanizado em banhos de xilol absoluto e incluso em parafina. Foram feitos cortes seriados no tecido (5 μm de espessura) com micrótomo rotativo/semiautomático (Leica Biosystems) que foram estendidos em lâminas silanizadas (lâminas StarFrost® silanizada polarizada Polycat Knittel) para ensaios imunológicos.

4.16.1 Imunomarcação das ilhotas

Os tecidos depositados em lâminas silanizadas foram desparafinizados a 70°C por 20 min, transferidos para xilol, etanol-xilol, etanol absoluto e finalmente lavados em água destilada para os ensaios de imunológicos. Os cortes foram lavados com 0,05 M TBS pH 7,4 e incubados com 0,01 tampão Tris EDTA contendo 0,05 % Tween-20 pH 9,0 por 25 min a 90°C. O bloqueio de peroxidases endógenas foi feita com uma solução 0,3 % de peróxido de hidrogênio antes da permeabilização com TBS contendo 0,1 % Tween-20 e 5 % albumina sérica bovina (BSA) à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários descritos na tabela 3, diluídos em PBS contendo 3 % BSA overnight a 4 °C. Após o período de incubação, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 2 horas à temperatura ambiente. Foi feita a revelação com diamino-benzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio, contracoloração com Hematoxilina de Ehrlich e montagem em Goma de Damar. A análise das lâminas foi feita em microscópio de luz (Axioskop 2 - Primo Star Binocular, Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera digital. A área e circularidade das ilhotas e a marcação com insulina foram analisadas no programa ImageJ Fiji (193). De acordo com diferenças na área, as ilhotas foram classificadas como: muito pequenas ($<300 \, \mu m^2$), pequenas ($300-1999 \, \mu m^2$), médias ($2000-9999 \, \mu m^2$) ou grandes (10000-49999 μm²), como descrito anteriormente (194). Os marcadores nucleares (Pax-4, Ki67 e NFκB p65) foram analisados no programa QuPath, como descrito anteriormente (195).

Tabela 3 – Anticorpos utilizados para imunomarcação das ilhotas.

Anticorpo Primário	Fabricante	Referência	Concentração
Insulina	Santa Cruz	sc-9168	1:500
Pax-4	Santa Cruz	sc-98942	1:75
NFκB p65	Santa Cruz	sc-372	1:200
Ki67	Millipore	ab15580	1:75

4.17 Análise estatística

Os testes foram realizados com no mínimo n=3 e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prisma 7 (La Jolla, CA, Estados Unidos). Realizou-se Teste t de Student não pareado bicaudal para comparação entre dois grupos, One-way ANOVA para comparar medidas entre múltiplos grupos e Two-way ANOVA para comparar múltiplas medidas inter-relacionadas entre grupos. Valor de p < 0,05 foi adotado como limite mínimo de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

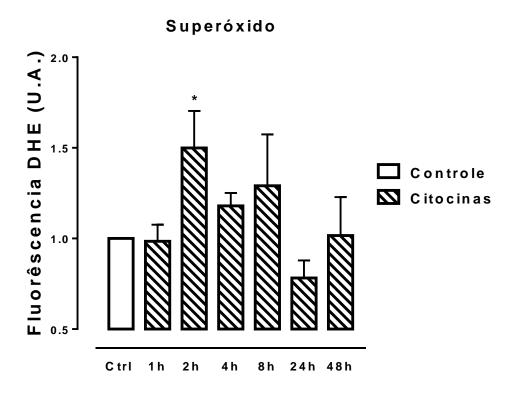
5.1 Produção de EROs induzida por citocinas pró-inflamatórias em ilhotas pancreáticas

Vários estudos mostram que a exposição de ilhotas e células beta pancreáticas a citocinas pró-inflamatórias, sozinhas ou em combinação, leva ao aumento de EROs, como um mecanismo envolvido na disfunção e perda de viabilidade e com grande relação com o complexo NOX (176, 181, 183, 196, 197). Nestes estudos, o aumento de EROs foi visto desde após exposições agudas, como 1 e 4 horas, até em tempos mais longos, como 12, 24 e 48 horas. No entanto, foi reportada também a diminuição da produção de EROs após 24 horas de exposição ao IL-1β (176). A partir disso, nosso objetivo inicial foi avaliar a produção temporal de EROs no nosso modelo experimental, no qual ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6J WT seriam expostas por diferentes períodos a uma combinação das citocinas pró-inflamatórias ligadas à insulite (IL-1β, TNF e IFN-γ).

5.1.1 Produção de superóxido com a sonda DHE

Inicialmente, utilizamos a sonda fluorescente redox sensível DHE, sensível a superóxido, o qual é o produto primário da atividade das NOXs (NOX1 e NOX2). As concentrações de citocinas utilizadas foram previamente estabelecidas por nosso grupo como indutoras de caspase 3 clivada e apoptose. Verificamos um aumento de superóxido entre 2 e 8 horas de exposição às citocinas, sendo estatisticamente significativo em 2 horas (figura 14).

Figura 14 – Produção de superóxido em ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6J expostas às citocinas pró-inflamatórias por diferentes períodos.



Ilhotas de camundongos C57BL/6J WT foram expostas por diferentes períodos a uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose. A intensidade de fluorescência foi analisada por citometria de fluxo usando a sonda DHE. n=3-6 experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. *p<0,05 quando comparado ao controle sem tratamento (Ctrl). One-Way ANOVA + Dunnett. U.A. – unidades arbitrárias.

O experimento nos deu uma pista importante sobre a dinâmica temporal da produção de superóxido em ilhotas pancreáticas expostas às citocinas. No entanto, alguns pontos importantes devem ser levados em consideração. Apesar de ser uma curva de tempo, o experimento da figura 14 é estático, ou seja, representa apenas um quadro de um momento final (*endpoint*). Como o superóxido é produzido e rapidamente dismutado a H₂O₂ por superóxido dismutases (198, 199), métodos que avaliem a produção de EROs em tempo real devem ser, sempre que possível, priorizados.

A maioria dos estudos de detecção de EROs utiliza sondas fluorescentes redox sensíveis, como o DHE e o DCFH-DA. Algumas vantagens para essas sondas incluem: a facilidade de utilização, a rapidez de detecção por serem altamente reativas, além de serem

metodologias relativamente baratas. No entanto, elas possuem várias desvantagens importantes. Essas sondas podem sofrer reações inespecíficas, podem sofrer rápida foto-oxidação, são oxidadas de maneira irreversível e possuem pouca ou nenhuma resolução de compartimento intracelular. O DHE atravessa a membrana plasmática e é oxidado, podendo formar dois produtos fluorescentes: um produto advindo da sua reação com superóxido e outro que é formado por reações redox não específicas (200). O espectro fluorescente de ambos os produtos se sobrepõe e, dependendo da técnica utilizada para analisar a fluorescência, pode ser difícil separar os sinais (201). A possibilidade de sofrer rápida foto-oxidação e o fato de ser oxidado de maneira irreversível são grandes impedimentos para sua utilização em estudos dinâmicos. Por fim, em relação ao compartimento intracelular de produção de EROs, já foi desenvolvido um DHE direcionado para a mitocôndria (MitoSOX), que tem sido amplamente utilizado (202, 203). No entanto, na concentração comumente utilizada, ele pode se difundir para o citosol, fazendo com que não seja seletivo para o compartimento mitocondrial, além de provocar perturbações na cadeia de transporte de elétrons, dificultando a interpretação dos resultados (203).

Recentemente, foram desenvolvidos métodos mais eficientes, como sensores redox geneticamente codificados, os quais permitem medidas redox em células vivas e modelos animais em tempo real e que nos permitem ter uma resolução de compartimento intracelular, como citosol versus matriz mitocondrial. Deste modo, nosso próximo passo foi utilizar este tipo de ferramenta para avaliar a produção temporal de H_2O_2 especificamente na matriz mitocondrial ou no citosol de ilhotas expostas às citocinas pró-inflamatórias.

5.1.2 Variações temporais nos níveis de H_2O_2 citosólico/nuclear ou mitocondrial e de NAD(P)H

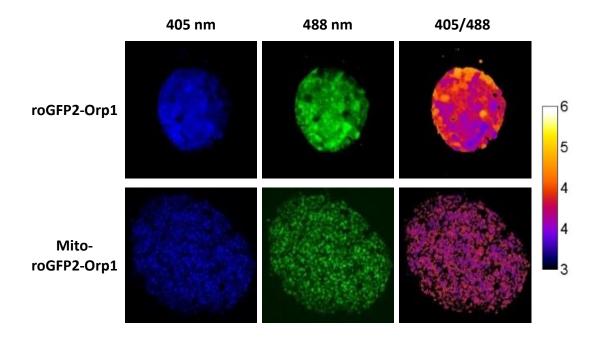
O desenvolvimento de sondas fluorescentes geneticamente codificadas representa um grande avanço que permite a análise temporal em células vivas e até em organismos inteiros, com seletividade em relação a uma espécie reativa específica e especificidade em relação ao compartimento intracelular (190). A localização compartimentar e a especificidade química dos sensores redox são cruciais para obter percepções significativas das medidas redox.

Buscamos uma colaboração com a Profa Dra Leticia Prates Roma do Departamento de Biofísica do Centro de Fisiologia Integrativa e Medicina Molecular da Universidade de Saarland em Homburg, Alemanha, num período de doutorado-sanduíche de seis meses. Como

detalhado nos métodos, a professora Leticia Roma gerou recentemente camundongos que expressam o sensor roGFP2-Orp1 (mito-roGFP2-Orp1 e roGFP2-Orp1). As principais vantagens deste método são a precisa localização intracelular, especificidade química e medida raciométrica, sendo uma grande vantagem em relação aos métodos estáticos. Assim o roGFP2-Orp1 responde rapidamente, eficientemente e especificamente ao H₂O₂.

Na figura 15, temos ilhotas representativas dos dois animais utilizados, nos comprimentos de onda referentes ao roGFP2 oxidado (405 nm) e reduzido (488 nm), bem como a razão 405/488. A escala de cores apresentada refere-se à figura que representa a razão e, portanto, quanto mais amarelo, mais oxidado encontra-se o sensor.

Figura 15 – Ilhotas roGFP2-Orp1 e mito-roGFP2-Orp1.



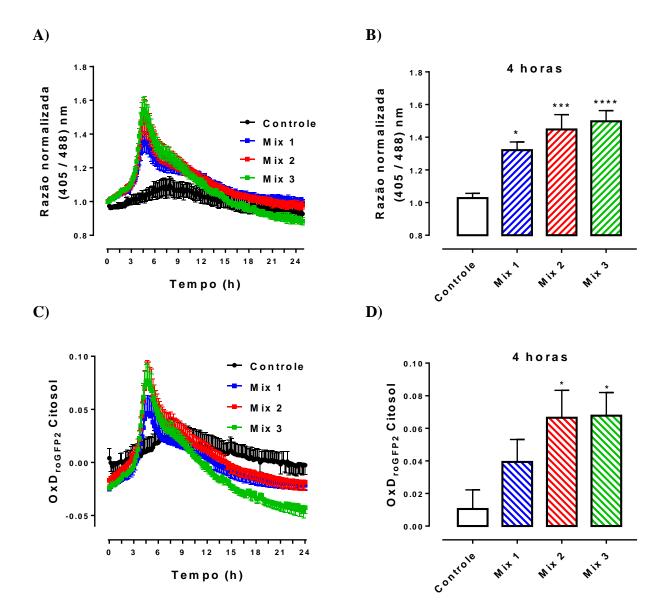
Imagens representativas de ilhotas de camundongos C57BL/6 que expressam constitutivamente o sensor redox para H_2O_2 , roGFP2-Orp1, no citosol/núcleo (C57BL/6J / roGFP2-Orp1) ou na matriz mitocondrial (C57BL/6N / mito-roGFP2-Orp1) em 405 nm (forma oxidada), 488 nm (forma reduzida) e a razão (405/488).

Utilizando estes modelos, monitoramos simultaneamente a oxidação do sensor roGFP2-Orp1, o que reflete os níveis de H₂O₂, e os níveis de NAD(P)H, através da autofluorescência do NAD(P)H em ilhotas de animais mito-roGFP2-Orp1 e roGFP2-Orp1, durante 24 horas de exposição às citocinas pró-inflamatórias.

Nas ilhotas roGFP2-Orp1, observamos um aumento transitório dos níveis de H₂O₂ após exposição às citocinas, com o início do pico em aproximadamente 4 horas, com todas as combinações de citocinas utilizadas (figura 16A,C). O resultado foi confirmado, conforme descrito nos métodos, através da razão 405/488 nm e do cálculo do OxD_{roGFP2} (figura 16A-D). De maneira interessante, ao mesmo tempo em que observamos o pico de produção de H₂O₂, observamos uma diminuição dos níveis de NAD(P)H (figura 17).

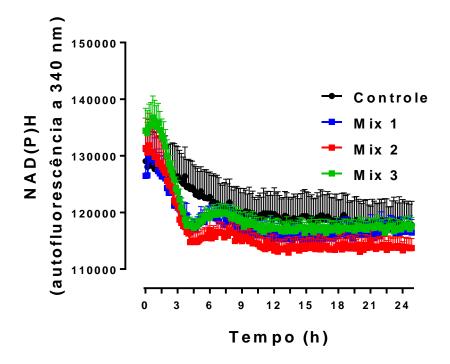
O aumento de H_2O_2 em aproximadamente 4 horas é compatível com os experimentos anteriores realizados no Brasil com a sonda DHE, nos quais há um aumento de produção de superóxido em 2 horas após a exposição às citocinas (figura 14). Sabe-se que o superóxido é produzido e rapidamente dismutado a H_2O_2 por SOD1 (citosólica) e SOD2 (mitocondrial) (204) e nossos resultados sugerem que a atividade de SOD1 deva estar aumentada a partir de 2 horas da exposição às citocinas até aproximadamente 6 horas, quando outros sistemas antioxidantes dependentes de NAD(P)H detoxificam o H_2O_2 .

Figura 16 – Variações em tempo real dos níveis de H₂O₂ citosólico/nuclear em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6J que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 no citosol/núcleo foram expostas por 24 horas a três combinações de citocinas pró-inflamatórias: Mix 1 (60 U/ml IL-1 β + 185 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ), Mix 2 (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) ou Mix 3 (50 U/ml IL-1 β + 50 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose. A) Produção de H_2O_2 citosólico/nuclear por 24 horas, representada pela razão 405/488 nm. B) Quantificação de A em 4 horas. C) Produção de H_2O_2 citosólico/nuclear por 24 horas, representada pelo OxD_{roGFP2} . D) Quantificação de C em 4 horas. A intensidade de fluorescência foi captada em leitor de placa a cada 10 minutos por 24 horas consecutivas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=3-4 com três replicatas por condição em cada experimento. *p<0,05, ***p<0,001 e ****p<0,001 quando comparado com a condição controle. B,D) One-Way ANOVA + Dunnet.

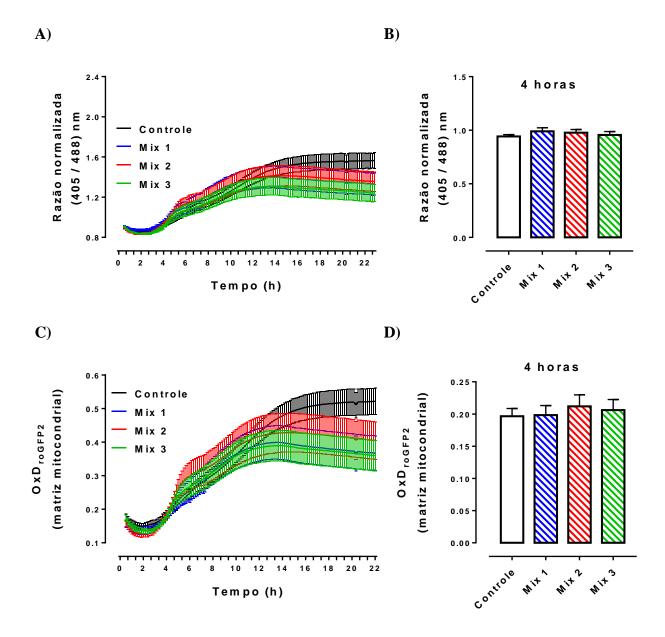
Figura 17 – Variações em tempo real dos níveis de NAD(P)H em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6J que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 no citosol/núcleo foram expostas por 24 horas a três combinações de citocinas pró-inflamatórias: Mix 1 (60 U/ml IL-1 β + 185 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ), Mix 2 (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) ou Mix 3 (50 U/ml IL-1 β + 50 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose. Os níveis de NAD(P)H foram detectados a partir de sua autofluorescência captada em leitor de placa a cada 10 minutos por 24 horas consecutivas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=3-4 com três replicatas por condição em cada experimento.

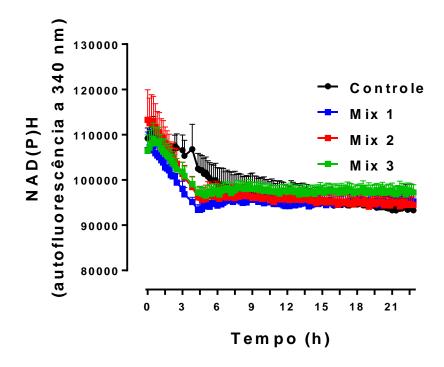
Já nas ilhotas mito-roGFP2-Orp1, mostramos que as citocinas não modulam a produção de H_2O_2 mitocondrial (figura 18A-D). A diminuição dos níveis de NAD(P)H induzida por citocinas é também observada neste experimento (figura 19), confirmando o observado nas ilhotas que expressam o sensor no citosol/núcleo (figura 17).

Figura 18 – Variações em tempo real dos níveis de H₂O₂ mitocondrial em ilhotas de camundongos mito-roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6N que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 na matriz mitocondrial foram expostas por 24 horas a três combinações de citocinas pró-inflamatórias: Mix 1 (60 U/ml IL-1 β + 185 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ), Mix 2 (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) ou Mix 3 (50 U/ml IL-1 β + 50 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose. A) Produção de H $_2$ O $_2$ mitocondrial por 24 horas, representada pela razão 405/488 nm. B) Quantificação de A em 4 horas. C) Produção de H $_2$ O $_2$ mitocondrial por 24 horas, representada pelo OxD $_{roGFP2}$. D) Quantificação de C em 4 horas. A intensidade de fluorescência foi captada em leitor de placa a cada 10 minutos por 24 horas consecutivas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=4 com três replicatas por condição em cada experimento. B,D) One-Way ANOVA + Dunnet.

Figura 19 – Variações em tempo real dos níveis de NAD(P)H em ilhotas de camundongos mito-roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6N que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 na matriz mitocondrial foram expostas por 24 horas a três combinações de citocinas pró-inflamatórias: Mix 1 (60 U/ml IL-1 β + 185 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ), Mix 2 (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) ou Mix 3 (50 U/ml IL-1 β + 50 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose. Os níveis de NAD(P)H foram detectados a partir de sua autofluorescência captada em leitor de placa a cada 10 minutos por 24 horas consecutivas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=4 com três replicatas por condição em cada experimento.

É importante ressaltar que os animais roGFP2-Orp1 e mito-roGFP2-Orp1 apresentam diferentes *backgrounds*: enquanto os animais roGFP2-Orp1 são C57BL/6J, os animais mito-roGFP2-Orp1 são C57BL/6N. Os animais C57BL/6N expressam em suas mitocôndrias a enzima *nicotinamide nucleotide transhydrogenase* (NNT), enquanto os animais C57BL/6J não possuem essa enzima. A NNT tipicamente produz NADPH mitocondrial, através da redução do NADP⁺ com consumo de NADH, sendo importante para a detoxificação de EROs mitocondriais (205). Em células beta pancreáticas, a NNT é responsável pelo aumento da razão NADPH/NADP⁺ induzida por glicose, sendo importante para a GSIS (205), e de maneira interessante, essa enzima também pode funcionar no caminho reverso, consumindo NADPH após adição de glicose (206). Portanto, essa diferença de genótipo poderia

influenciar os resultados obtidos em relação às medidas de NAD(P)H e deve ser sempre levada em consideração.

Nós especulamos que a diminuição do NAD(P)H induzida por citocinas deva ocorrer devido a sua utilização pelas enzimas do sistema de defesa antioxidante intracelular, ativado como maneira de contrapor o aumento de H₂O₂ citosólico, e pode ser responsável pela diminuição nos níveis de H₂O₂ observada em tempos subsequentes (figura 16A,C). Sabe-se que o principal mecanismo pelo qual o H₂O₂ exerce seus efeitos é via oxidação seletiva de tióis presentes em proteínas, o que é antagonizado por diversos sistemas redutores de tióis dependentes de NAD(P)H (forma reduzida da NADP⁺) (207).

Dessa forma, mostramos pela primeira vez um aumento transiente dos níveis de H₂O₂ citosólico/nuclear em células beta pancreáticas expostas às citocinas pró-inflamatórias, com uma possível utilização de NAD(P)H pelas defesas antioxidantes intracelulares. Além disso, no nosso modelo não observamos modulação dos níveis de H₂O₂ mitocondriais pelas citocinas.

Nos últimos dez anos tem-se falado bastante sobre a importância da compartimentalização da produção de EROs. Quando falamos em compartimentalização, nos referimos não apenas a estruturas que são separadas por uma membrana, como no caso das organelas, mas também a microambientes, micro- ou nano-domínios e locais de contato com a membrana (*membrane contact sites*).

No caso do citosol, a produção de EROs não é difusa, mas sim aumentada localmente em microambientes, como balsas lipídicas ou *lipid rafts*, microdomínios da membrana ricos em colesterol e esfingolipídeos que concentram várias moléculas sinalizadoras como receptores, proteínas quinases e fosfatases, entre outros, formando um microdomínio que otimiza a sinalização celular (208).

Como o aumento de H₂O₂ após exposição às citocinas foi principalmente observado no citosol, temos um indicativo da participação das NADPH oxidases nesse processo, já que são importantes fontes citosólicas de EROs. Sabe-se que a NOX2 é expressa constitutivamente em *lipid rafts* e evidências indicam sua co-localização com receptores de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1β, nesses microdomínios em células MCF-7 (linhagem de câncer de mama) (209). Por fim, fatores apoptóticos estimularam a co-localização de subunidadades da NOX2 (gp91^{phox}, p47^{phox} e Rac) em *lipid rafts* em células endoteliais coronarianas, efeito que levou à morte celular induzida pela formação de EROs (210).

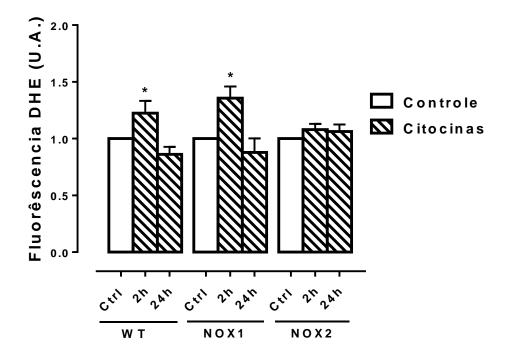
5.2 Papel de NOX na produção de EROs induzida por citocinas pró-inflamatórias em ilhotas pancreáticas

Estudos anteriores indicam que o aumento de EROs provocado por citocinas próinflamatórias parece estar associado à atividade de NOX1 e 2, visto que foi prevenido pela inibição de uma das subunidades da NOX (Rac1) pelo uso de NSC23766 e GGTI 2147 em células beta INS 832/13 (181) e pela inibição de NOX1/4 por ML171 em células beta INS-1 e β-TC3 (183). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias induziram menor produção de EROs em ilhotas NOX2 KO em relação às ilhotas do controle WT (196).

Portanto, em seguida avaliamos o papel da NOX na produção de EROs em nosso modelo, utilizando inicialmente a sonda DHE em ilhotas WT e KO para as isoformas NOX1 ou NOX2. A exposição de ilhotas de animais WT por 2 horas às citocinas levou a um aumento na produção do superóxido, enquanto em 24 horas há uma aparente diminuição (figura 20), como já visto anteriormente (figura 14).

Curiosamente, em ilhotas de animais NOX1 KO, observamos também um aumento no superóxido em 2 horas de exposição às citocinas, assim como em ilhotas controle (figura 20), sugerindo que a NOX1 não esteja envolvida neste processo. Já em ilhotas de animais NOX2 KO as citocinas não induziram a produção de superóxido (figura 20). Sugerimos que frente às citocinas, a NOX2 deva ter papel fundamental na produção de EROs.

Figura 20 – Produção de superóxido em ilhotas pancreáticas de camundongos WT, NOX1 KO ou NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias.



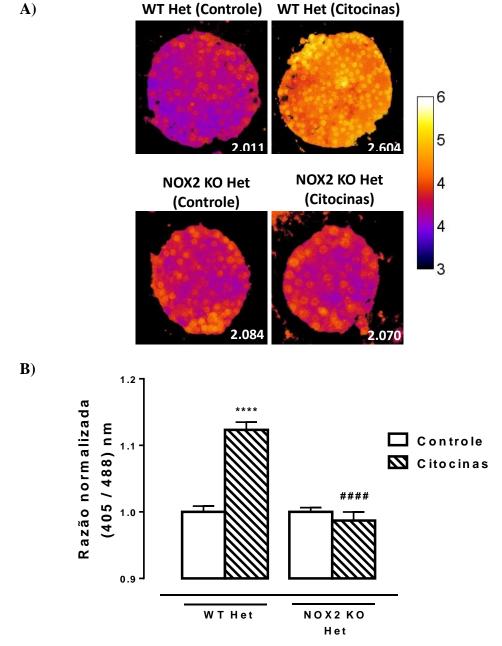
Ilhotas de camundongos WT, NOX1 KO (NOX1) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas por 2 horas (2h) ou 24 horas (24h) a uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ). A intensidade de fluorescência foi analisada por citometria de fluxo usando a sonda DHE. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de aproximadamente 30 ilhotas/condição para cada animal. WT (n=13-15), NOX1 (n=6) e NOX2 (n=7-9). * p<0,05 quando comparado ao respectivo controle no mesmo genótipo. Oneway ANOVA + Dunnett. U.A. – unidades arbitrárias.

A fim de investigar melhor a participação das NOXs, realizei um segundo período de seis meses no laboratório da Profa. Dra. Leticia Roma. Ainda durante o primeiro período em seu laboratório, iniciamos a geração dos animais NOX2 KO:roGFP2-Orp1, como já descrito nos métodos. Inicialmente, tentamos fazer a leitura da fluorescência das ilhotas no mesmo leitor de microplacas utilizado anteriormente (figuras 16-19). No entanto, como as ilhotas são heterozigotas para o sensor, a fluorescência total não era suficiente para este tipo de metodologia. Portanto, utilizamos outra estratégia para este experimento, a histologia redox, como descrito anteriormente nos métodos. Como este método é estático, escolhemos expor as ilhotas ao mix 2 de citocinas por 4h30 min, momento do pico de produção de H₂O₂ no citosol/núcleo (figura 16A,C).

Observamos um aumento na oxidação do sensor das ilhotas controle (WT Het) após 4h30min de exposição às citocinas pró-inflamatórias (figura 21A-B), como esperado pelos experimentos realizados anteriormente (figura 16A,C). Além disso, as ilhotas NOX2 KO Het

expostas às citocinas não apresentaram aumento na oxidação do sensor (figura 21A-B), confirmando o envolvimento de NOX2 neste processo.

Figura 21 – Produção H₂O₂ citosólico/nuclear em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 e NOX2 KO:roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias por 4h30 min.



Ilhotas de camundongos controle roGFP2-Orp1 heterozigoto (WT Het) ou roGFP2-Orp1:NOX2 KO (NOX2 KO Het) foram expostas por 4h30 min a uma combinação de citocinas pró-inflamatórias: $10 \text{ U/ml IL-1}\beta + 100 \text{ U/ml}$ TNF + 14 U/ml IFN- γ em meio RPMI com 10 mM de glicose. A) Figuras representativas da oxidação de roGFP2-Orp1 após diferentes condições. Os valores indicam a razão (405/488). B) Produção de H_2O_2 citosólico/nuclear em ilhotas WT Het ou NOX2 KO Het após 4h30 min de exposição à combinação de citocinas. A intensidade de fluorescência foi captada no microscópio Axio Observer 7 e as imagens quantificadas no programa ImageJ Fiji. ****p<0,0001 em relação ao respectivo controle no mesmo genótipo; ####p<0,0001 quando comparado à condição WT Het citocinas. n=6-9. One-Way ANOVA + Tukey.

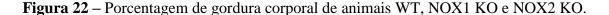
Para futura publicação, vamos realizar o mesmo experimento da figura 21 com ilhotas de camundongos NOX1 KO cruzados com roGFP2-Orp1. O cruzamento já foi realizado pela prof. Leticia Roma e os experimentos já deveriam ter sido realizados. Porém, devido às diversas restrições impostas pela pandemia da Covid-19 no primeiro semestre de 2020, ainda não houve a possibilidade para finalização desta parte da pesquisa.

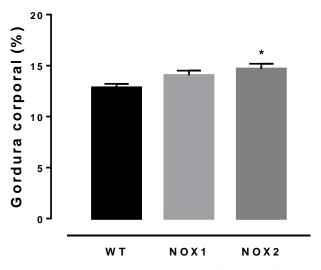
5.3 Caracterização dos animais NOX1 KO e NOX2 KO

Em seguida, iniciamos a caracterização dos animais NOX1 KO e NOX2 KO através da análise da composição corporal e realização de teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT).

5.3.1 Porcentagem de gordura corporal

Fizemos a análise da porcentagem de gordura corporal e de massa magra dos animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO em aparelho de ressonância magnética nuclear. Observamos que os animais NOX2 KO apresentam maior porcentagem de gordura do que as duas outras linhagens de animais utilizadas (figura 22). Não obtivemos diferenças em relação à porcentagem de massa magra (dados não mostrados).





Os animais WT, NOX1 KO (NOX1) e NOX2 KO (NOX2) foram analisados quanto à composição de gordura corporal em aparelho de ressonância magnética nuclear. Os resultados foram expressos em porcentagem de gordura (%) em relação ao peso corporal total e apresentados como média ± SEM com 10 diferentes animais para WT e 9 diferentes animais para NOX1 e NOX2. * p<0,05 comparado com o WT. One-way ANOVA + Dunnett.

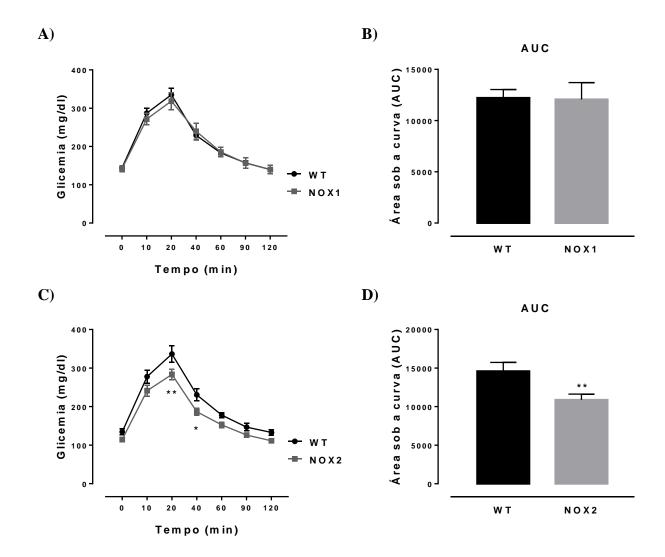
Foi demonstrado que os adipócitos apresentam a NOX4 como principal isoforma expressa, além das outras isoformas da NOX em menor proporção (211). Sabe-se que a atividade de NOX4 é de extrema importância para a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (212). A ausência de NOX2 talvez gere um mecanismo de compensação, no qual haja maior expressão de NOX4 nos adipócitos e, consequentemente, maior formação de tecido adiposo. No entanto, tais mecanismos fogem do contexto de nosso projeto e mereciam ser investigados em outra oportunidade.

5.3.2 Homeostase glicêmica

Utilizamos os testes de tolerância à glicose (GTT) e de tolerância à insulina (ITT) como formas de avaliar a homeostase glicêmica dos animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO. Observamos que a glicemia de jejum apresentava-se próxima a 100 mg/dl, típica de animais não diabéticos, e que não houve diferenças em relação ao GTT dos animais WT e NOX1 KO (figura 23A,B). Já os animais NOX2 KO mostraram-se mais tolerantes à glicose do que animais WT (figura 23C), refletindo numa menor área sob a curva (figura 23D).

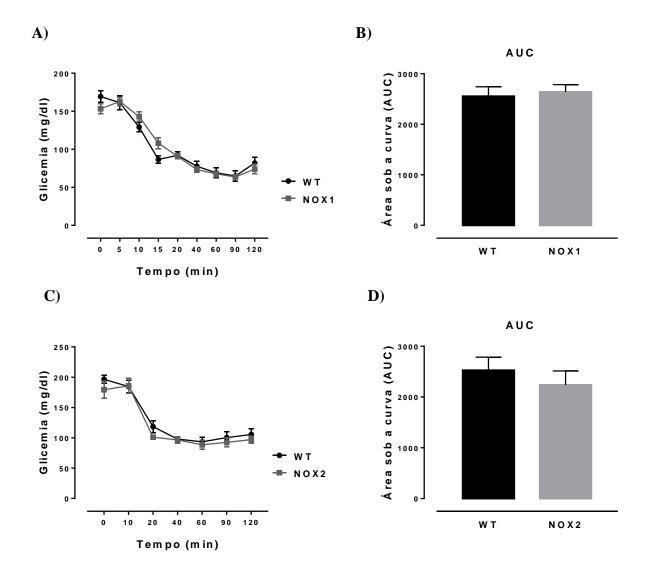
Não observamos diferenças em relação aos diferentes genótipos no teste de ITT (figura 24) e nem no kITT (figura 25). Vale ressaltar que os animais NOX2 KO apresentaram maior porcentagem de gordura corporal (figura 22), no entanto isso não refletiu numa maior resistência à insulina (figuras 24C,D e 25B).

Figura 23 – Teste de tolerância à glicose (GTT) de animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO.



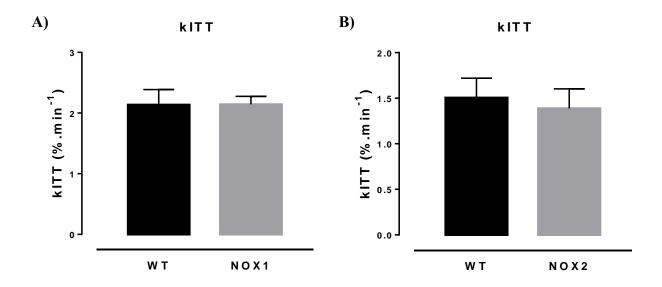
Os animais foram submetidos a jejum de 10 a 12 horas. A glicemia foi então mensurada em glicosímetro no tempo zero (0) e, após administração intraperitoneal de solução de glicose (1g glicose/kg), nos tempos 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos. A) Curva de decaimento da glicemia (mg/dl) dos animais WT e NOX1 KO (NOX1). B) Área sob a curva (AUC) de A. C) Curva de decaimento da glicemia (mg/dl) dos animais WT e NOX2 KO (NOX2). D) Área sob a curva (AUC) de C. Os resultados foram expressos como média ± SEM de 12 a 17 animais para WT, 10 animais para NOX1 e 14 animais para NOX2. * p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao WT. Two-way ANOVA + Sidak para curva de GTT e Teste t de Student para AUC.

Figura 24 – Teste de tolerância à insulina (ITT) de animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO.



Após 4 horas de restrição alimentar, a glicemia foi mensurada em glicosímetro no tempo zero (0) e, após administração intraperitoneal de solução de insulina (0,75 UI insulina/kg), nos tempos 5, 10, 15, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos. A) Curva de decaimento da glicemia (mg/dl) dos animais WT e NOX1 KO (NOX1). B) Área sob a curva (AUC) de A. C) Curva de decaimento da glicemia (mg/dl) dos animais WT e NOX2 KO (NOX2). D) Área sob a curva (AUC) de C. Os resultados foram expressos como média ± SEM de 6-8 animais para WT, 10 animais para NOX1 e 8 animais para NOX2. Two-way ANOVA + Sidak para curva do ITT e Teste t de Student para AUC.

Figura 25 – Constante de decaimento de glicose (kITT) de animais WT, NOX1 KO e NOX2 KO.



Após restrição alimentar de 4 horas, a glicemia foi mensurada em glicosímetro no tempo zero (0) e, após administração intraperitoneal de solução de insulina (0,75 UI insulina/kg), nos tempos 5, 10, 15, 20 e 40. A) kITT de WT e NOX1 KO (NOX1). B) kITT de WT e NOX2 KO (NOX2). Os resultados foram expressos como média ± SEM com 6-8 diferentes animais para WT, 10 animais para NOX1 e 8 animais para NOX2. Teste t de Student.

Durante o teste ITT, as alterações nos níveis plasmáticos de glicose antes e após a administração de insulina indicam a sensibilidade do organismo à ação da insulina, ou seja, diminuições na sensibilidade à insulina refletem na resistência periférica à ação do hormônio. Já no teste GTT, as alterações na glicemia após administração de glicose, refletem a capacidade das células beta pancreáticas secretarem insulina em resposta ao aumento da glicemia e, portanto é um teste comumente utilizado para avaliação da função das células beta (213, 214). Portanto, como o resultado benéfico da ausência de NOX2 foi observado no teste de GTT, e não no de ITT, trata-se de um indicativo de um efeito na função da célula beta pancreática, o que fomos explorar melhor nos experimentos seguintes.

5.4 Papel de NOX2 na funcionalidade de ilhotas expostas às citocinas pró-inflamatórias

Avaliamos a funcionalidade das ilhotas pelo ensaio de secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) e pela homeostase de cálcio.

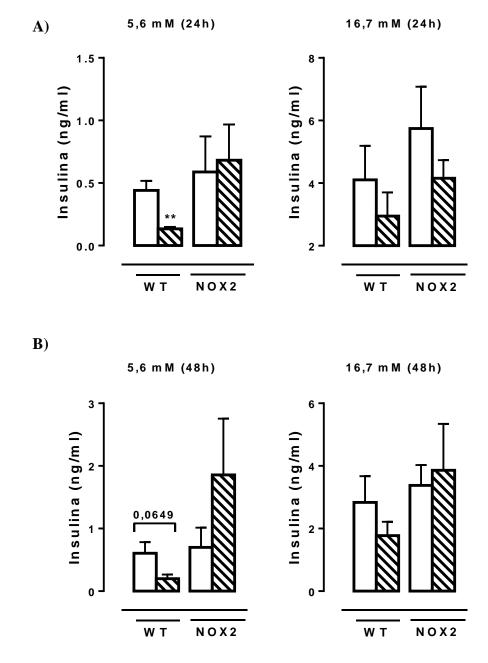
5.4.1 Secreção de insulina

A exposição de ilhotas e células beta pancreáticas a combinações de citocinas próinflamatórias conhecidamente leva ao prejuízo da secreção de insulina, com possível participação de isoformas da NOX. Em estudos anteriores, a piora da função secretória devido à exposição às citocinas foi associada às isoformas NOX1 e NOX2, visto que foi prevenida em células INS-1 por um inibidor da NOX1 (ML171) (183), em células MIN6 transfectadas com shRNA contra NOX1 (197) e em ilhotas de animais NOX2 KO (196).

Em seguida, analisamos a resposta secretória de ilhotas NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias. Verificamos que, como esperado, as citocinas levaram a uma diminuição da secreção de insulina em animais WT, tanto em 24 horas (figura 26A), como em 48 horas (figura 26B) em 5.6 mM de glicose. No entanto, ilhotas NOX2 KO foram protegidas do efeito das citocinas, mantendo sua capacidade secretória, sugerindo o envolvimento de NOX2 na disfunção das células beta pancreáticas num ambiente inflamatório.

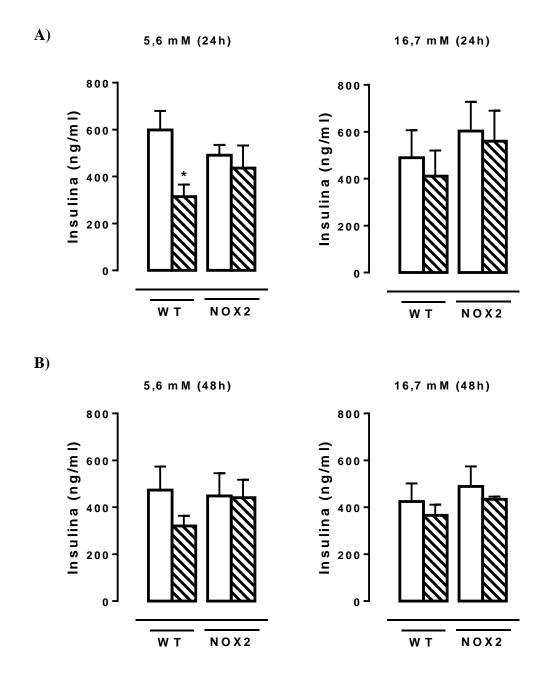
Avaliamos também o conteúdo intracelular de insulina nas mesmas ilhotas utilizadas no experimento mostrado na figura 26. Esta medida mostrou que as citocinas pró-inflamatórias levaram a uma diminuição desse conteúdo nos animais WT, efeito não observado nos animais NOX2 KO (figura 27).

Figura 26 – Secreção de insulina de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias.



Ilhotas de camundongos controle (WT) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao mix de citocinas próinflamatórias ($10 \text{ U/ml IL-1}\beta + 100 \text{ U/ml TNF} + 14 \text{ U/ml IFN-}\gamma$) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 24 horas (24 ho) ou 48 horas (48 h). Condição controle sem citocinas (barras brancas); condição com citocinas (barras tracejadas). Após o período de incubação, as ilhotas foram incubadas com 5.6 mM ou 16.7 mM de glicose em Krebs Henseleit por 1 hora. A análise da secreção de insulina foi feita por FRET. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de aproximadamente 10 ilhotas/condição para cada animal, sendo utilizados 5 animais por grupo. A) 24 horas. B) 48 horas. **p<0,01 quando comparado ao respectivo controle no mesmo genótipo. Teste t de Student.

Figura 27 – Conteúdo intracelular de insulina de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias.



Ilhotas de camundongos controle (WT) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao mix de citocinas próinflamatórias (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 24 horas (24h) ou 48 horas (48h). Condição controle sem citocinas (barras brancas); condição com citocinas (barras tracejadas). Após o período de incubação, as ilhotas foram incubadas com 5,6 mM ou 16,7 mM de glicose em Krebs Henseleit por 1 hora e posteriormente lisadas com álcool-ácido para análise do conteúdo intracelular de insulina por FRET. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de aproximadamente 10 ilhotas/condição para cada animal, sendo utilizados 5 animais por grupo. A) 24 horas. B) 48 horas. *p<0,05 quando comparado ao respectivo controle no mesmo genótipo. Teste t de Student.

5.4.2 Homeostase de cálcio

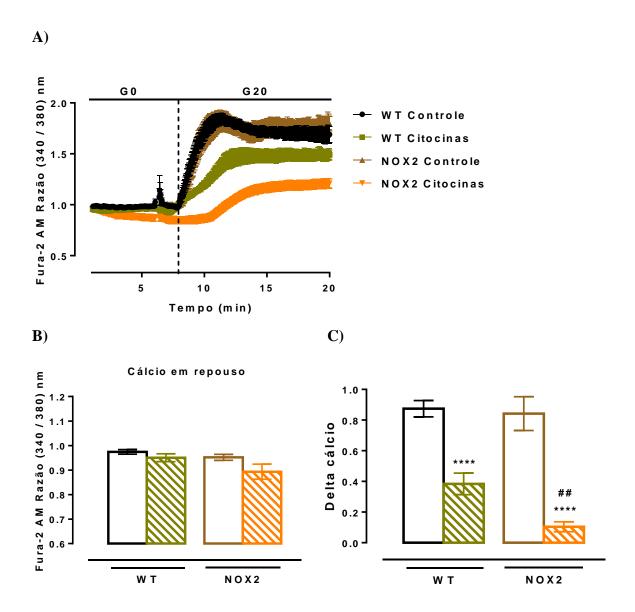
O aumento das concentrações intracelulares de cálcio induzido pela glicose é o principal gatilho para a exocitose dos grânulos contendo insulina (215, 216). Ilhotas pancreáticas e células beta expostas às citocinas pró-inflamatórias sabidamente apresentam perturbações na homeostase de cálcio (217). Como as ilhotas NOX2 KO foram protegidas da disfunção secretória associada à exposição às citocinas pró-inflamatórias (figura 26), buscamos analisar a homeostase do cálcio em nosso modelo.

Após incubação de 24 horas com as citocinas pró-inflamatórias, ilhotas controle WT ou NOX2 KO foram expostas à sonda Fura-2 AM para avaliar, por microscopia de fluorescência, os níveis de cálcio. Foram utilizados dois protocolos para avaliação de: i) cálcio total em resposta à adição de glicose e ii) mecanismo de entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) (191).

Para avaliação da homeostase de cálcio total frente ao estímulo de glicose, o protocolo foi dividido em duas partes: primeiro em tampão sem glicose, seguido de adição de alta glicose (20 mM). A curva de resposta de animais WT e NOX2 KO na condição Controle é similar (figura 28A). Em relação ao cálcio em repouso, ou seja, durante os minutos anteriores à adição de glicose, ilhotas NOX2 KO Controle apresentaram uma leve diminuição em relação às ilhotas WT Controle (figura 28B). Como esperado, as citocinas inflamatórias levaram a uma diminuição de cálcio total em ilhotas controle (WT) em resposta à adição de glicose (figura 28A-C).

Curiosamente, ilhotas NOX2 KO expostas às citocinas apresentam menores níveis de cálcio, o que fica evidenciado pelo delta, calculado pelas médias do minuto 11 (pico de cálcio) subtraídas das médias do minuto 7,5 (momento imediatamente anterior à adição de glicose) (figura 28C), ou seja, a ausência de NOX2 parece ser ainda pior do que a exposição de citocinas para o balanço de cálcio. Este fato é intrigante, pois animais NOX2 KO são mais tolerantes à glicose e suas ilhotas foram protegidas da disfunção secretória associada à exposição às citocinas pró-inflamatórias (figura 26). Como o cálcio é um sinalizador muito importante para a secreção de insulina estimulada por glicose, não era esperado que as ilhotas NOX2 KO expostas às citocinas tivessem uma resposta de cálcio tão baixa.

Figura 28 – Dinâmica de cálcio total de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias.



Ilhotas de camundongos controle (WT) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao mix de citocinas próinflamatórias (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 24 horas. Em seguida, as ilhotas foram incubadas com Fura-2 AM por 2 horas. A análise de fluorescência foi feita no microscópio Axio Observer 7. As ilhotas foram primeiramente incubadas na ausência de glicose (G0), seguida de adição de 20 mM de glicose (G20). A linha tracejada indica o momento da adição de glicose. A) Curva de cálcio total. B,C) Barras brancas (condição sem citocinas), barras tracejadas (condição com citocinas). As cores correspondem às condições descritas em A. B) Cálcio em repouso. C) Delta, representando a resposta à glicose. O delta foi calculado pelos valores das médias do minuto 11 subtraídas das médias do minuto 7,5. Os resultados foram expressos como média \pm SEM com n=4-15 ilhotas. ****p<0,0001 em relação ao respectivo controle no mesmo genótipo e ##p<0,01 quando comparado à condição WT citocinas. One-way ANOVA + Tukey.

No modelo pelo qual a glicose estimula a secreção de insulina, ocorre o fechamento dos canais K_{ATP} com subsequente influxo de cálcio, o qual é o principal gatilho para a exocitose dos grânulos de insulina (28) (figura 3). No entanto, este mecanismo não parece explicar completamente a GSIS. Neste sentido, Sakuma M e colaboradores mostraram que a glicose induz a secreção de insulina tanto por mecanismos dependentes de cálcio, como por mecanismos independentes de cálcio, indicando que a GSIS possa ocorrer na ausência de cálcio (38).

No entanto, estudos subsequentes mostram que os canais K_{ATP} e o influxo de cálcio são cruciais para a GSIS, porém sua maior relevância parece ocorrer na fase de disparo (*triggering pathway*); enquanto a via amplificadora ou sustentada da GSIS (*amplifying pathway*), responsável por aumentar a magnitude da resposta secretora, seria independente de K_{ATP} e do influxo de cálcio (36, 37). Esta via não provoca o aumento de cálcio intracelular, mas sim intensifica a resposta secretora ao cálcio, apesar dos mecanismos subjacentes não serem totalmente claros (36, 37).

A piora observada na homeostase de cálcio total das ilhotas NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias foi surpreendente, visto que mantiveram a capacidade secretória. Isto significa que apesar da piora na homeostase de cálcio, a quantidade de cálcio nas ilhotas ainda foi suficiente para manter o mecanismo de disparo da GSIS. Especulamos, portanto, que as ilhotas NOX2 KO mantém sua capacidade secretória de maneira apenas parcialmente dependente de cálcio.

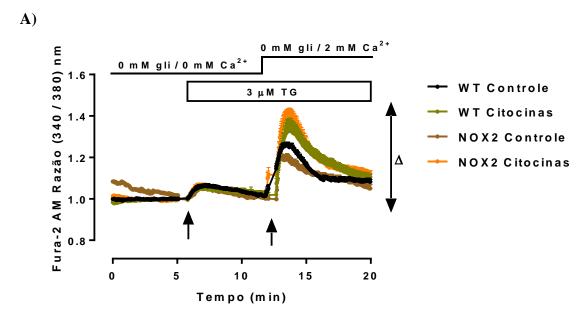
Sabe-se que o principal estoque de cálcio das nossas células é o RE e que a exposição de células beta pancreáticas às citocinas pró-inflamatórias leva a perturbações na homeostase do cálcio de RE, um dos mecanismos responsáveis por induzir o estresse de RE (218). A partir daí, avaliamos no nosso modelo o mecanismo SOCE, que é ativado a partir da depleção das concentrações de cálcio no RE. O esvaziamento de cálcio do RE dispara uma resposta altamente regulada para restabelecer os níveis de cálcio nesta organela, através da indução da entrada de cálcio proveniente do meio extracelular, através de seu gradiente eletroquímico, pela abertura de canais para cálcio presentes na membrana plasmática, conhecidos como Canais para Cálcio Operados por Estoque (*Store Operated Calcium Channels*: SOC). O cálcio que entra através de SOC pode se difundir através do citosol para o núcleo, RE e mitocôndria.

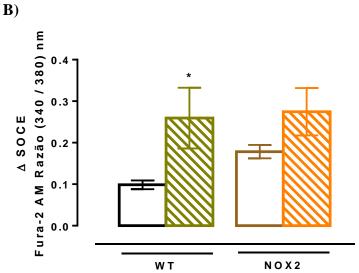
O sensor de cálcio no RE é a proteína transmembrane-spanning stromal interaction molecule 1 (STIM1). Quando a concentração de cálcio no RE cai, o STIM1 migra para junções entre o RE e a membrana plasmática e interage com a proteína Calcium release-

activated calcium channel protein 1 (Orai1), presente no canal para cálcio na membrana plasmática, mediando o influxo de cálcio. O mecanismo SOCE é essencial para muitas funções fisiológicas, e mutações de STIM ou Orai estão envolvidas à patogênese de algumas doenças autoimunes e inflamatórias. Recentemente, foi visto que inibidores farmacológicos de SOCE levaram à diminuição da secreção de insulina em ilhotas de rato e linhagens de células beta, mostrando o envolvimento deste mecanismo com a regulação da secreção de insulina (219). Além disso, condições que mimetizam o DM, como ácido palmítico e citocinas pró-inflamatórias alteram SOCE e aumentam o estresse de RE (191, 220).

Para avaliação do mecanismo SOCE, o protocolo foi dividido em três partes: primeiros cinco minutos em tampão sem glicose e sem cálcio, seguido da adição de tapsigargina (concentração final: 3 μM), inibidor da bomba de cálcio Ca²+-ATPase do RE (SERCA), para provocar a depleção de cálcio presente no RE, e finalmente adição de cálcio (concentração final: 2 mM) para avaliar o mecanismo de captação de cálcio extracelular pela ilhota. Notamos uma resposta exacerbada ao tratamento de citocinas (figura 29A-B), o que era esperado, já que as citocinas conhecidamente provocam depleção do cálcio do RE. Tal efeito foi observado tanto em ilhotas WT, quanto em ilhotas NOX2 KO (figura 29A-B). No entanto, ao observar a figura 29B, notamos que o delta SOCE foi levemente maior em ilhotas NOX2 KO ainda na condição controle, quando comparadas às ilhotas WT. Isto fez com que a variação dos deltas entre a condição citocinas e a condição controle de ilhotas NOX2 KO seja ligeiramente menor do que em ilhotas WT.

Figura 29 – Mecanismo de entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias.





Ilhotas de camundongos controle (WT) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao mix de citocinas pró-inflamatórias (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 24 horas. Em seguida, as ilhotas foram incubadas com Fura-2 AM por 2 horas. A análise de fluorescência foi feita no microscópio Axio Observer 7. As ilhotas foram primeiro expostas a 0 mM de glicose e Ca²+, seguida de adição de 3 μ M de tapsigargina (TG) e por fim adição de 2 mM de Ca²+. A) Curva do SOCE. As setas indicam o momento de adição das diferentes condições. B) Barras brancas (condição sem citocinas), barras tracejadas (condição com citocinas). As cores correspondem às condições descritas em A. Delta SOCE. O delta foi calculado pelos valores das médias do minuto 13,5 subtraídas das médias do minuto 12,5. Os resultados foram expressos como média \pm SEM com n=7-14 ilhotas. *p<0,05 em relação ao respectivo controle no mesmo genótipo. One-way ANOVA + Sidak.

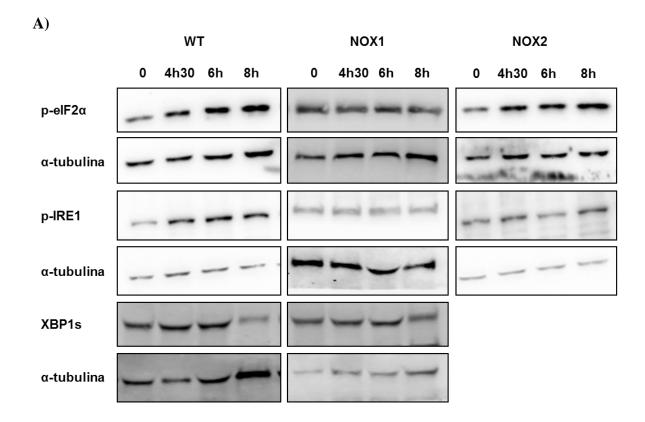
5.5 Papel de NOX no estresse de RE de ilhotas expostas às citocinas pró-inflamatórias

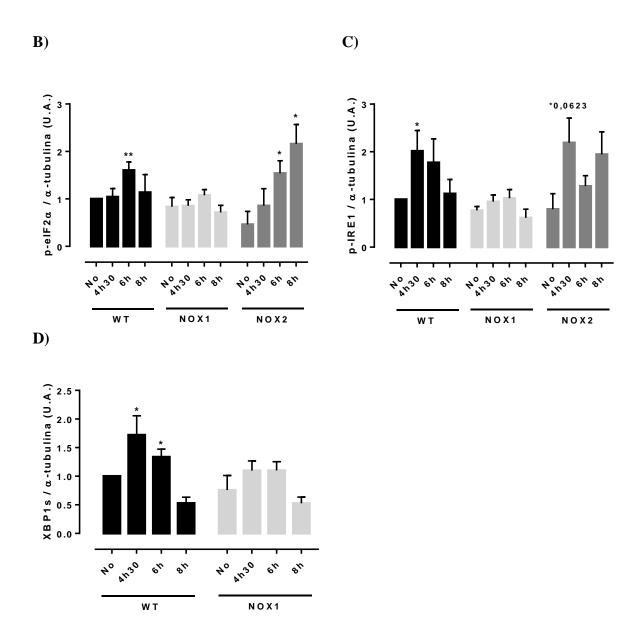
Vários artigos já demonstraram que o tratamento com citocinas pró-inflamatórias induz a ativação do estresse de RE em células beta pancreáticas (75, 81, 82, 218, 221, 222). Em um dos estudos, foi visto que IL-1β + IFN-γ levam a uma diminuição dos níveis de Ca²⁺ intracelular paralelamente à indução de expressão proteica de CHOP, p-IRE1 e p-PERK, um processo dependente da indução da síntese de NO (218).

Também existem relatos na literatura mostrando uma inter-relação entre os estresses oxidativo e de RE, inclusive sobre o envolvimento da NOX no estresse de RE, porém em outros tipos celulares (223-227), sem comprovações em células beta pancreáticas. A partir disso, decidimos avaliar a indução do estresse de RE por citocinas pró-inflamatórias nas ilhotas com ausência da NOX. Para tanto, avaliamos a expressão proteica de algumas proteínas envolvidas no estresse de RE (p-IRE1, p-eIF2α e XBP1s) após exposição das ilhotas WT, NOX1 KO e NOX2 KO por diferentes períodos ao mix de citocinas pró-inflamatórias. Escolhemos os tempos de incubação com as citocinas de acordo com o pico de produção de H₂O₂ citosólico/nuclear, observado anteriormente (figura 16A,C): 4h30 (no início do pico), 6 horas (logo após o início do pico) e 8 horas (período posterior ao pico).

O mix de citocinas, como esperado, levou ao aumento da expressão dos marcadores de estresse de RE nas ilhotas dos animais WT: em 4h30 de exposição às citocinas houve aumento de expressão de p-IRE1 (figura 30A,C) e XBP1s (figura 30A,D) e em 6 horas de exposição houve aumento de p-eIF2α (figura 30A,B) e XBP1s (figura 30A,D). De maneira interessante, os animais NOX1 mostraram proteção contra o estresse de RE induzido pelas citocinas, sugerindo uma participação de NOX1 nesta via (figura 30). Por fim, compatível com o que observamos durante a avaliação do mecanismo SOCE, animais NOX2 KO não obtiveram nenhuma proteção contra o estresse de RE induzido pelas citocinas e aparentemente apresentaram um aumento ainda maior na expressão proteica de p-eIF2α.

Figura 30 – Expressão proteica de marcadores do estresse de retículo em ilhotas de camundongos WT, NOX1 KO e NOX2 KO expostas às citocinas próinflamatórias.





Ilhotas de camundongos controle (WT), NOX1 KO (NOX1) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao mix de citocinas pró-inflamatórias (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 4h30, 6h ou 8h. A) figura representativa de 3-9 experimentos independentes para as proteínas peIF2 α , p-IRE1 e XBP1s. B) gráficos com a quantificação das bandas específicas em A e corrigidas pelos valores correspondentes à α -tubulina, mostrado como média \pm SEM. *p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao respectivo controle sem citocinas no mesmo genótipo. Teste t de Student. U.A. – unidades arbitrárias.

O envolvimento da NOX com a sinalização da UPR e o estresse de RE já foi mostrado em outros tipos celulares (223-227). Na maioria dos estudos, a perda de função da NOX promove diminuição de alvos associados ao estresse de RE ou outras vias levam à ativação tanto da NOX como do estresse de RE.

Em células cardíacas de camundongos diabéticos, a relação entre NOX e estresse de RE foi mostrada pela utilização do inibidor não específico apocinina, a qual reduziu a produção de EROs e inibiu o estresse de RE. Apesar da apocinina não ser específica, um efeito semelhante foi encontrado em camundongos *knockout* para uma das subunidades da NOX (Rac1) (223). Em neutrófilos, a ativação da NOX com PMA ativou as vias PERK e IRE-1 da UPR e a inibição da NOX com DPI provocou atenuação da UPR (224). A presença de NOX2 também está envolvida na indução de estresse de RE por colesterol e 7-cetocolesterol em macrófagos, que via CHOP-CAMKII-JNK levam à apoptose e estresse oxidativo (225). Em células do músculo liso de aorta, tanto a tunicamicina, um clássico indutor do estresse de RE, como o 7-cetocolesterol induziram o aumento da expressão de NOX4 (226).

Apesar das inúmeras evidências para o envolvimento de NOX na sinalização da UPR, a conexão das vias moleculares ainda não é bem conhecida, ou seja, não se sabe como exatamente ocorre a regulação da interação de ambos os estresses e menos ainda se sabe em relação às células beta pancreáticas e às diferentes isoformas da NOX. Aqui mostramos evidências do envolvimento de NOX1, e não de NOX2, na ativação da UPR e do estresse de RE em células beta pancreáticas expostas às citocinas pró-inflamatórias.

Muito pouco se sabe sobre a localização intracelular das isoformas da NOX. Um estudo em células do músculo liso vascular sugere que a NOX1 esteja localizada no RE (228). Caso isto também fosse válido para as células beta pancreáticas, poderia explicar a influência que observamos da NOX1 na ativação do estresse de RE. O conhecimento sobre a localização intracelular das diferentes isoformas da NOX nas células beta deveria ser priorizado e poderia confirmar a relevância de cada isoforma no microambiente onde está localizada.

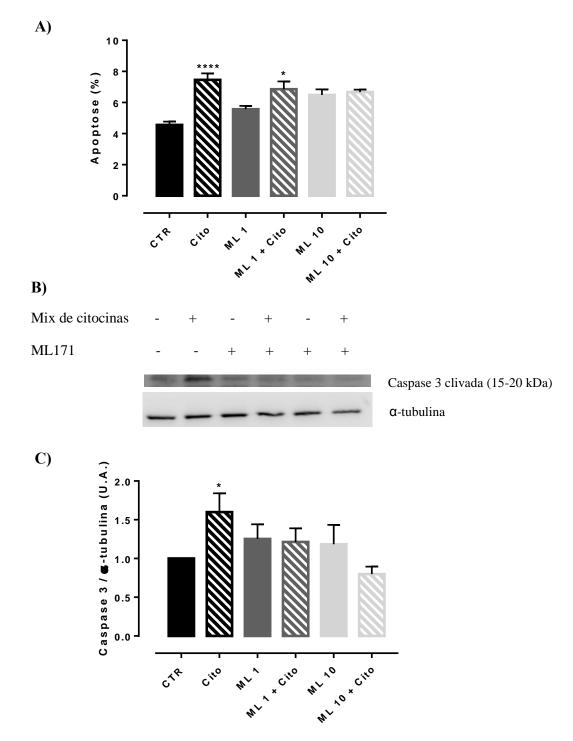
5.6 Papel de NOX na viabilidade de células beta e ilhotas expostas às citocinas próinflamatórias

As citocinas pró-inflamatórias sabidamente levam à morte das células beta pancreáticas através de diferentes mecanismos, como a ativação do estresse de RE, a indução de iNOS e consequente estresse nitrosativo, e a produção de EROs e consequente estresse oxidativo (68, 69, 75, 82). O envolvimento da NOX na perda de viabilidade das células beta pancreáticas já foi mostrado em outros estudos. A ativação de caspase 3 clivada e indução de apoptose provocada por 24 horas de exposição às citocinas em células INS-1 e ilhotas humanas foram prevenidas pelo inibidor da NOX1 (ML171) (183). No entanto, também em ilhotas humanas, o inibidor GLX7013114 (seletivo NOX4) protegeu contra a apoptose induzida por 48 horas de incubação com as citocinas, enquanto os inibidores ML171 (seletivo NOX1) e Phox-I2 (seletivo NOX2) falharam em proteger as ilhotas (160).

Como os poucos resultados disponíveis em trabalhos anteriores ainda são controversos quanto ao papel da cada isoforma e a fim de confirmar o envolvimento da NOX no nosso modelo, avaliamos a viabilidade de células INS-1E e de ilhotas de camundongo expostas às citocinas pró-inflamatórias. No caso da INS-1E, realizamos experimentos utilizando um inibidor farmacológico de NOX1 (ML171) na presença ou ausência do mix de citocinas pró-inflamatórias. ML171 foi desenvolvido em 2010 como um potente antagonista de NOX1 e também, com menor especificidade, de NOX4 (229), tendo sido utilizado em alguns estudos da função destas NADPH oxidases em células beta pancreáticas (160, 165, 183, 197). Nos resultados a seguir, apresentamos dados de apoptose das células INS-1E após exposição ao mix de citocinas pró-inflamatórias na ausência ou presença de ML171.

Observamos que o tratamento com as citocinas pró-inflamatórias leva, como esperado, a um aumento na apoptose, o que é prevenido pelo ML171 na concentração de 10 µM (figura 31A). É importante ressaltar que o tratamento apenas com o ML171 leva a um pequeno aumento na apoptose dessas células, que no controle é de 4,5%, em 1 µM de ML171 é 5,5 % e em 10 µM de ML171 é 6,4 %. Na concentração mais baixa de inibidor, não houve proteção da apoptose provocada pelas citocinas em um dos métodos utilizados (figura 31A), no entanto, quando aumentamos a concentração de inibidor houve proteção na apoptose, mostrando que a inibição de NOX1 e/ou NOX4 previne a indução da apoptose por citocinas pró-inflamatórias. O resultado da expressão da caspase 3 clivada (figura 31B-C) corrobora o resultado obtido com o kit Via Count.

Figura 31 – Apoptose de células INS-1E após exposição às citocinas pró-inflamatórias na ausência ou presença do antagonista da NOX1 e 4 (ML171).



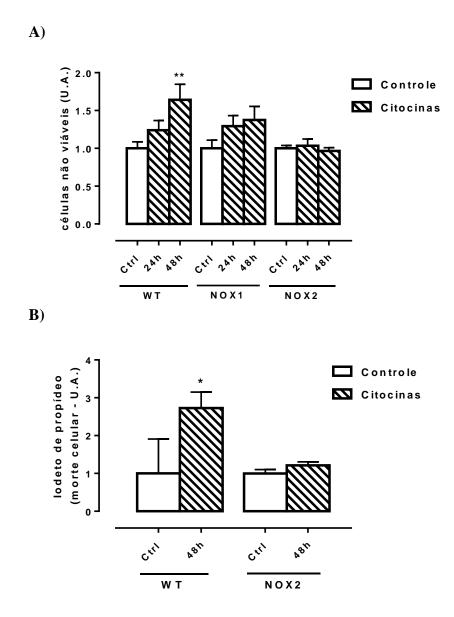
Células INS-1E foram expostas por 24 horas a uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (Cito: 10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) na ausência ou presença do antagonista da NOX1 e 4 ML171, utilizado nas concentrações 1 μ M (ML 1) ou 10 μ M (ML 10). A) Análise de apoptose por citometria de fluxo usando o kit Via Count. B e C) Análise de apoptose através da expressão de caspase 3 clivada por western blot. B) figura representativa de 4 experimentos independentes. C) gráfico com a quantificação da banda obtida em B e corrigida pelos valores das respectivas bandas correspondentes à α -tubulina. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. *p<0,05 e ****p<0,0001 comparado com o controle (CTR), n=4. One-way ANOVA + Sidak. U.A. – unidades arbitrárias.

Em seguida, avaliamos também a viabilidade de ilhotas WT, NOX1 KO e NOX2 KO expostas às citocinas por 24 e 48 horas. Por citometria de fluxo, utilizando o kit ViaCount, observamos, como esperado, um aumento de morte de células nas ilhotas pancreáticas de animais WT após 48 horas de exposição às citocinas (figura 32A). Além disso, enquanto ilhotas de animais NOX1 KO são apenas parcialmente protegidas contra a morte induzida pelas citocinas, as ilhotas NOX2 KO são claramente protegidas (figura 32A). Este resultado é promissor em relação ao envolvimento de NOX na morte das células beta em um ambiente inflamatório.

A fim de confirmar o envolvimento de NOX2 na apoptose das células das ilhotas pancreáticas, fizemos uma segunda análise por citometria de fluxo utilizando outro kit (*FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI*) e notamos mais uma vez a proteção das ilhotas NOX2 KO contra a apoptose frente ao ataque de citocinas (figura 32B). Como já discutido, o envolvimento de NOX1 e de NOX4 na morte de células beta induzida por citocinas pró-inflamatórias já foi mostrado em estudos anteriores (160, 183), no entanto, mostramos aqui pela primeira vez o envolvimento de NOX2.

A proteção contra a morte induzida pelo ataque de citocinas em ilhotas NOX1 KO e células INS-1E tratadas com inibidor NOX1/4 pode ocorrer pela modulação do estresse de RE, visto que observamos o envolvimento de NOX1 na ativação do estresse de RE. No entanto, a proteção maior contra a morte induzida pelas citocinas foi observada em ilhotas ausentes de NOX2, isoforma que aparentemente não apresenta relação com a indução do estresse de RE. Os resultados indicam a complexidade dos múltiplos efeitos desencadeados por cada uma das duas isoformas (NOX1 e NOX2) e apontam para a necessidade de mais estudos voltados à avaliação da ativação das isoformas separadamente.

Figura 32 – Viabilidade celular de ilhotas de camundongos WT, NOX1 KO e NOX2 KO expostas às citocinas pró-inflamatórias.



Ilhotas de camundongos controle (WT), NOX1 KO (NOX1) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao mix de citocinas pró-inflamatórias (citocinas) (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 24 horas (24h) ou 48 horas (48h). A análise de viabilidade celular foi feita após dispersão das células das ilhotas com tripsina, seguida de incubação com o kit Via Count (A) ou com o FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (B). A análise de fluorescência foi feita por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de aproximadamente 30 ilhotas/condição para cada animal. U.A. - unidades arbitrárias. A) n=8-11 para WT, n=5-7 para NOX1 e n=5 para NOX2 e B) n=3-4 para WT e n=4 para NOX2. *p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao respectivo controle no mesmo genótipo. One-Way ANOVA + Dunnett.

5.7 Expressão gênica de isoformas da NOX após exposição às citocinas pró-inflamatórias

Como os efeitos principais observados até aqui foram com a NOX2, realizamos silenciamento de NOX2 com RNA curto de interferência (siRNA) em células INS-1E e posteriormente analisamos a expressão gênica de isoformas da NOX e do fator de transcrição PDX-1 após a exposição às citocinas pró-inflamatórias.

Após o protocolo de silenciamento de NOX2, as células INS-1E foram expostas ao mix de citocinas pró-inflamatórias por 24 horas. Como as citocinas sabidamente induzem o estresse de RE, porém também ativam outras vias, utilizamos a tapsigargina (inibidor da bomba de Ca²⁺ SERCA2) como ativadora do estresse de RE. Avaliamos o mRNA de NOX1, NOX2, NOX4 e PDX-1.

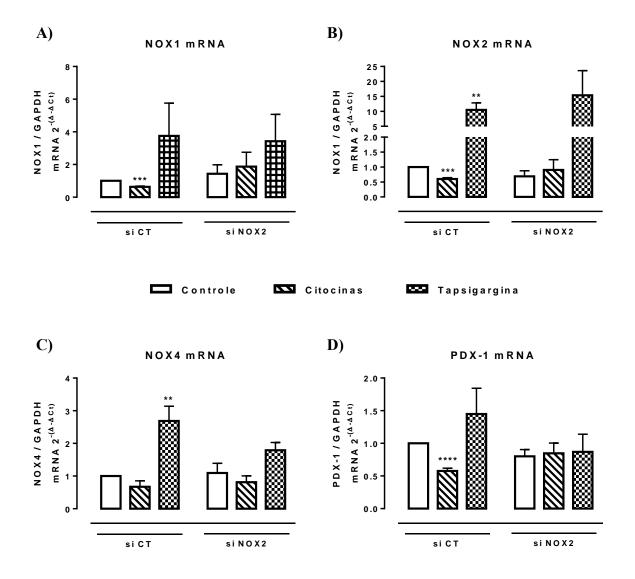
Notamos que a exposição por 24 horas à combinação de citocinas pró-inflamatórias levou à diminuição de mRNA de NOX1 (figura 33A) e NOX2 (figura 33B), mas não de NOX4 (figura 33C). Este resultado parece corroborar o que observamos em ilhotas de camundongos WT, nas quais a exposição às citocinas por 24 horas leva a uma tendência de diminuição na produção de superóxido (figuras 14 e 20), o que provavelmente pode ser proveniente da menor expressão de NOX1 e 2 após a exposição às citocinas (figura 33).

Nosso grupo mostrou anteriormente que ilhotas de rato tratadas com IL-1β por 24 horas tiveram diminuição na expressão proteica de uma subunidade da NOX2 (p47^{phox}) (176). Com nossos resultados mostramos pela primeira vez a modulação de isoformas NOX por citocinas. Outro dado interessante é que a tapsigargina parece levar a um aumento de mRNA de NOX2 (figura 33B) e de NOX4 (figura 33C). Similarmente parece haver uma tendência em provocar um aumento também de NOX1 (figura 33A). Isso mostra uma interação entre a ativação do estresse de RE e a modulação dessas NOX.

Avaliamos também o mRNA do fator de transcrição PDX-1, importante para função e manutenção do fenótipo da célula beta, atuando como regulador do promotor da insulina (230). Estudos anteriores mostram que em células beta pancreáticas, a ativação de JNK leva à translocação do fator PDX-1 do núcleo para o citosol, limitando a síntese de insulina, contribuindo, desta forma, para a disfunção das células (231, 232). Nossos resultados indicam que o tratamento com as citocinas levou à diminuição de mRNA de PDX-1 nas células transfectadas com siCT, o que não foi observado em células transfectadas com siNOX2 (figura 33D), sugerindo um papel da NOX2 na disfunção também por esta via. Este resultado corrobora os resultados anteriores de proteção de ilhotas NOX2 KO contra a disfunção

secretória frente à exposição às citocinas pró-inflamatórias. De maneira interessante, o tratamento das células com siNOX2 parece abolir de maneira geral os efeitos de citocinas na diminuição da expressão de NOX1, NOX2 e PDX-1 (figura 33A, B e D).

Figura 33 – Modulação de isoformas NOX e PDX-1 por citocinas pró-inflamatórias e pelo silenciamento de NOX2.



Células INS-1E foram transfectadas com 60 nM de siRNA contra NOX2 (siNOX2) ou siRNA controle (siCT). Após 72 horas da transfecção, as células foram expostas a uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (10 U/ml IL-1 β + 100 U/ml TNF + 14 U/ml IFN- γ) por 24 horas ou tapsigargina (1 μ M) por 16 horas. As células foram utilizadas em ensaios de RT-PCR em tempo real e os resultados foram expressos como média \pm SEM para 3-4 experimentos independentes, utilizando o gene do GAPDH como controle interno. **p<0,01, ***p<0,001 ou ****p<0,0001 em relação ao respectivo controle. Teste t de Student.

5.8 Papel da NOX em modelos in vivo

5.8.1 Indução de DM1 com injeções intraperitoneais de estreptozotocina

Estudos anteriores apontaram que a ausência ou inibição de NOX protege contra o desenvolvimento de diabetes. Xiang e colaboradores mostraram que animais NOX2 KO foram mais tolerantes à glicose que os animais controle após indução de DM com estreptozotocina (STZ) (196) e Veluthakal e colaboradores mostraram que em modelo animal de DM1 espontâneo (NOD), a administração de um inibidor de uma das subunidades da NOX (Rac1) preveniu o desenvolvimento de diabetes (180).

A fim de avaliar também os efeitos *in vivo* da ausência de NOX no desenvolvimento do diabetes, em especial do DM1, utilizamos um protocolo de indução de diabetes através de injeções de doses baixas e múltiplas de estreptozotocina (MLDZ). A estreptozotocina (STZ) promove a destruição das células beta pancreáticas e é comumente utilizada por inúmeros grupos para indução de diabetes (233). No entanto, normalmente utiliza-se uma dose única de STZ em uma concentração alta, eficaz para destruir as células beta e provocar o diabetes. Para o presente estudo, contudo, optamos por utilizar um protocolo com doses baixas e múltiplas, a fim de simular uma inflamação local na ilhota, como a que ocorre durante a instalação da insulite e desenvolvimento do DM1 (234).

Registramos a evolução do peso corporal (g) e da glicemia (mg/dl) dos animais no primeiro dia após o término das injeções e, a partir daí, em dias alternados até a confirmação do diabetes (tabelas 4 e 5). Animais NOX2 KO na condição controle apresentaram peso levemente menor do que NOX1 KO controle no início do acompanhamento, mas não permaneceram assim até o final, quando os pesos de todos os grupos eram similares (tabela 4). Animais diabéticos apresentaram menor peso, quando comparados aos seus respectivos controles saudáveis, porém sem diferença estatística. A confirmação do diabetes ocorreu com três medidas seguidas de glicemia acima de 200 mg/dl para todos os animais, o que ocorreu no 11° dia após o término das injeções de STZ (tabela 5).

Tabela 4 – Evolução do peso corporal (g) durante MLDZ.

	Peso corporal (g)								
	Antes STZ	1º dia após STZ	3º dia após STZ	5º dia após STZ	7º dia após STZ	9º dia após STZ	11º dia após STZ		
WT CT (n=5)	$26,4 \pm 0,2$	25,0 ± 0,3	25,8 ± 0,4	$25,2 \pm 0,2$	$25,0 \pm 0,3$	$25,4 \pm 0,2$	$26,2 \pm 0,2$		
WT DM (n=5)	$26,\!4\pm0,\!7$	$24,2\pm0,7$	$24,6\pm0,6$	$24,4\pm0,7$	$24,2\pm0,6$	$24,2\pm0,8$	$25,2\pm0,9$		
NOX1 CT (n=5)	$28,0\pm0,3$	$27,\!4\pm0,\!4$	$27,2\pm0,5$	$26,6 \pm 0,7$	$27,\!4\pm0,\!2$	$27,0\pm0,4$	$27,6\pm0,5$		
NOX1 DM (n=5)	$27,8\pm0,9$	$26,2 \pm 1,3$	$26,2 \pm 1,0$	$26,0\pm0,7$	$26,6\pm1,2$	$26,\!4\pm0,\!8$	$26,6\pm0,7$		
NOX2 CT (n=5)	24,6 ± 0,9††	24,2 ± 1,0†	24,2 ± 1,0†	$24,2\pm0,9$	$24,2 \pm 0,7 \dagger$	$24,4\pm0,8$	$25,0\pm0,4$		
NOX2 DM (n=5)	$25,2 \pm 1,1$	23,0 ± 1,0†	23,2 ± 0,8†	$24,0 \pm 0,5$	23,2 ± 0,7††	23,2 ± 0,6†	$24,6 \pm 0,5$		

Os dados são expressos como média \pm SEM do peso corporal (g) dos animais (n=5 por grupo). Animais saudáveis (CT), animais diabéticos (DM). †p<0.05 e †† p<0.01 vs NOX1 KO na mesma condição. Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

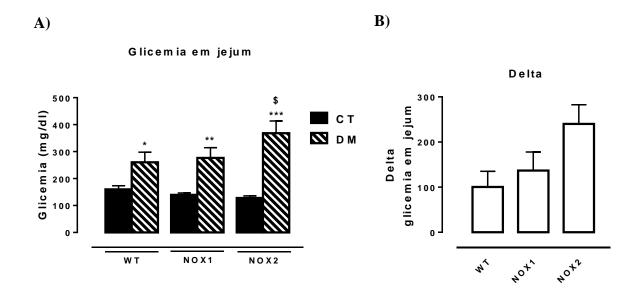
Tabela 5 – Monitoramento da glicemia (mg/dl) após MLDZ.

	Glicemia (mg/dl)									
	1º dia após STZ	3º dia após STZ	5º dia após STZ	7º dia após STZ	9º dia após STZ	11º dia após STZ				
WT CT (n=5)	$163,2 \pm 12,3$	$180,2 \pm 3,0$	$167,4 \pm 8,6$	$181,6 \pm 9,1$	$158,0 \pm 9,2$	$178,6 \pm 2,9$				
WT DM (n=5)	$140,0\pm9,7$	$224,4 \pm 21,7$	294,6 ± 34,9*	$293,4 \pm 25,0$	343,0 ± 58,9**	423,2 ± 72,0**				
NOX1 CT (n=5)	$149,2 \pm 10,3$	$167,6 \pm 11,6$	$156,4 \pm 11,1$	$189,0\pm7,5$	$169,6 \pm 10,6$	$184,6 \pm 6,8$				
NOX1 DM (n=5)	$151,0\pm8,4$	202,0 ± 19,9	274,0 ± 59,9*	391,0 ± 53,1**	343,8 ± 51,5**	364,4 ± 56,4**				
NOX2 CT (n=5)	$149,2 \pm 8,2$	$161,6 \pm 13,0$	$154,0 \pm 12,1$	$162,2 \pm 7,7$	$154,2 \pm 4,7$	$173,6 \pm 10,6$				
NOX2 DM (n=5)	$138,4 \pm 10,1$	218.8 ± 9.0	335,6 ± 50,1**	378,2 ± 40,9**	412,0 ± 51,4**	496,8 ± 41,3**				

Os dados são expressos como média \pm SEM da glicemia plasmática (mg/dl) dos animais (n=5 por grupo). Animais saudáveis (CT), animais diabéticos (DM). *p<0,05, **p<0,0001 em relação ao respectivo controle não-diabético. Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

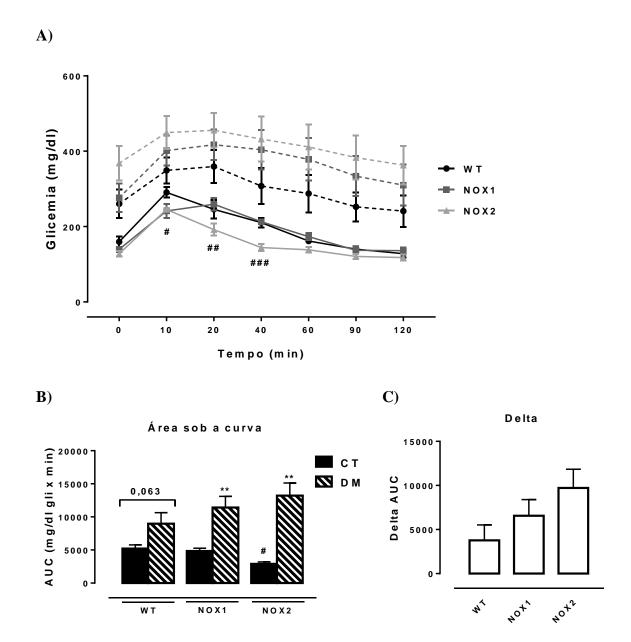
Um dia após a confirmação do diabetes, os animais foram submetidos ao teste de GTT. Como esperado, os animais diabéticos (DM) apresentaram maior glicemia de jejum, em relação aos seus respectivos controles saudáveis (CT) (figura 34A). Curiosamente, animais NOX2 KO DM apresentaram glicemia de jejum levemente maior do que WT CT (figura 34A), evidenciado pelo delta, calculado para cada genótipo através dos valores obtidos nos animais diabéticos subtraídos pelos valores de seus respectivos controles saudáveis (figura 34B). No início do GTT, no minuto 10, NOX1 KO CT e NOX2 KO CT foram mais tolerantes à glicose do que WT CT (figura 35A). Essa melhor tolerância à glicose se manteve nos animais NOX2 KO CT até o minuto 40 (figura 35A), refletindo numa menor área sob a curva (figura 35B), assim como já observado anteriormente (figura 23C,D). Ainda no GTT, todos os grupos diabéticos apresentaram intolerância à glicose, quando comparados aos seus respectivos controles saudáveis, porém sem diferenças entre os genótipos (figura 35A). Portanto, no nosso modelo os animais KO para NOX não foram protegidos do desenvolvimento de diabetes. No intuito de uma avaliação mais detalhada, após o teste de GTT, coletamos os pâncreas para incluí-los em parafina e analisar a área e circularidade das ilhotas, além de imunomarcação.

Figura 34 – Glicemia em jejum de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após indução de DM1 por MLDZ.



Os animais foram submetidos a jejum de 10 a 12 horas para o Teste de Tolerância à Glicose (GTT). A glicemia foi então mensurada em glicosímetro no tempo zero. A) Glicemia de jejum (mg/dl) no tempo zero do GTT. Animais saudáveis (CT) (barras pretas); animais diabéticos (DM) (barras tracejadas). B) Delta de A. Os resultados foram expressos como média ± SEM de 5 animais por grupo. A) *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado com o respectivo controle saudável no mesmo genótipo (Teste t de Student) e \$p<0,05 quando comparado com WT DM (Two-way ANOVA + Tukey). B) One-way ANOVA + Dunnett.

Figura 35 – GTT de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após indução de DM1 por MLDZ.

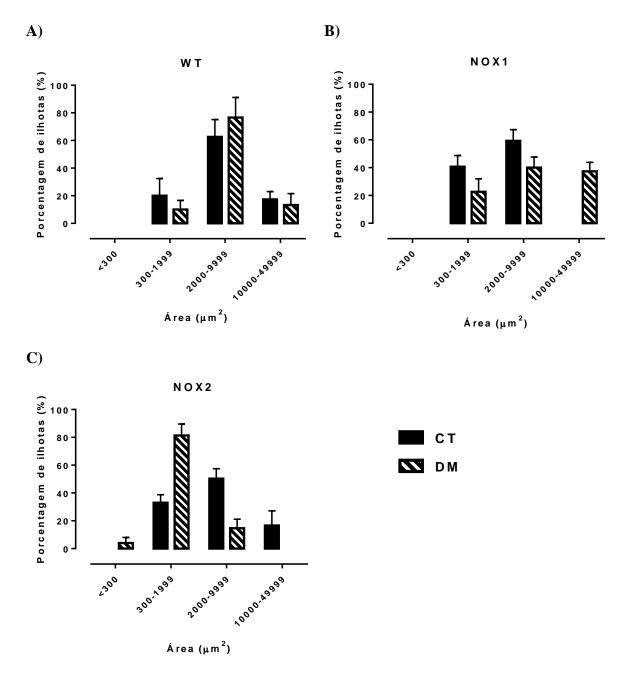


Para o Teste de Tolerância à Glicose (GTT), os animais foram submetidos a jejum de 10 a 12 horas. A glicemia foi então mensurada em glicosímetro no tempo zero (0) e, após administração intraperitoneal de solução de glicose (1g glicose/kg), nos tempos 10, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos. A) Curva de decaimento da glicemia (mg/dl) durante o GTT. WT (círculos), NOX1 KO (NOX1) (quadrados), NOX2 KO (NOX2) (triângulos). Animais saudáveis (linhas cheias), animais diabéticos (linhas tracejadas). B) Área sob a curva (AUC) de A. Animais saudáveis (CT) (barras pretas); animais diabéticos (DM) (barras tracejadas). C) Delta de B. Os resultados foram expressos como média ± SEM de 5 animais por grupo. A) #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 quando comparado com WT CT (Two-way ANOVA + Tukey). B) **p<0,05 quando comparado com WT CT (Two-way ANOVA + Dunnett.

5.8.2 Análise morfométrica e imunomarcação das ilhotas

Primeiramente, avaliamos a área e a circularidade das ilhotas dos diferentes grupos. Para analisar a área, dividimos as ilhotas por tamanho em: muito pequenas (<300 μm²), pequenas (300-1999 μm²), médias (2000-9999 μm²) ou grandes (10000-49999 μm²), como descrito anteriormente (194). No grupo WT, encontramos ilhotas pequenas, médias e grandes, com maior porcentagem de ilhotas médias, independente do grupo saudável ou diabético (figura 36A). Comparado ao WT CT, NOX1 KO CT apresentou mais ilhotas pequenas e menos ilhotas grandes e a indução do diabetes neste grupo parece levar à diminuição do número de ilhotas pequenas e médias e aumento de ilhotas grandes (figura 36B). A distribuição de ilhotas NOX2 KO CT foi similar às ilhotas WT CT, mas de maneira interessante as ilhotas NOX2 KO diabéticas apresentaram diminuição de ilhotas médias e grandes, induzindo aumento de ilhotas pequenas e muito pequenas (figura 36C). No entanto, não podemos afirmar se há produção de ilhotas menores ou se apenas as ilhotas menores sobrevivem.

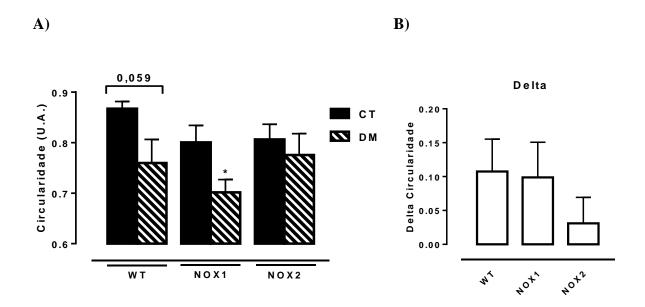
Figura 36 – Área de ilhotas de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após indução de DM1 por MLDZ.



Os resultados foram expressos como porcentagem de ilhotas em cada grupo, apresentados pelo tamanho em μm^2 . Animais saudáveis (CT) (barras pretas); animais diabéticos (DM) (barras tracejadas). A) WT. B) NOX1 KO (NOX1). C) NOX2 KO (NOX2). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo.

Em seguida, analisamos o grau de circularidade das ilhotas, um parâmetro frequentemente relacionado à arquitetura e estágio de maturação das ilhotas. Embora sem diferença estatística entre a circularidade das ilhotas dos diferentes genótipos na condição controle, nós observamos uma tendência à diminuição de circularidade em ilhotas NOX1 KO CT e NOX2 KO CT em relação à WT CT (figura 37A). Como esperado, animais WT DM apresentam menor grau de circularidade do que seu respectivo controle saudável (figura 37A). O mesmo foi observado em animais NOX1 KO (figura 37A). Curiosamente, ilhotas NOX2 KO DM foram protegidas dessa diminuição de circularidade (figura 37A), evidenciado pelo delta (figura 37B), levantando a hipótese do envolvimento de NOX2 na perturbação da arquitetura da ilhota.

Figura 37 – Circularidade de ilhotas de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após indução de DM1 por MLDZ.



A) Circularidade das ilhotas em unidades arbitrárias (U.A.). Animais saudáveis (CT) (barras pretas); animais diabéticos (DM) (barras tracejadas). B) Delta de A. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. A) *p<0,05 quando comparado com o respectivo controle saudável no mesmo genótipo (Teste t de Student). B) One-way ANOVA + Dunnett.

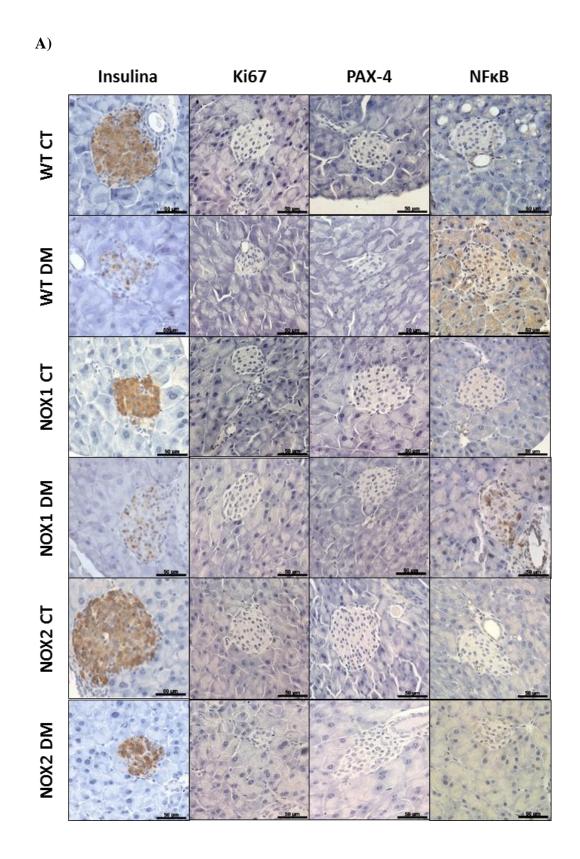
Por fim, iniciamos a imunomarcação dessas ilhotas utilizando anticorpos contra: insulina, para avaliar as células beta pancreáticas; Ki67, para avaliar a proliferação celular; Pax-4, para avaliar a diferenciação precoce das células beta; NFκB p65 para avaliar a apoptose no ambiente inflamatório (figura 38A). Além da porcentagem de marcação, calculamos o delta para cada genótipo, através dos valores obtidos nos animais diabéticos subtraídos dos valores de seus respectivos controles saudáveis.

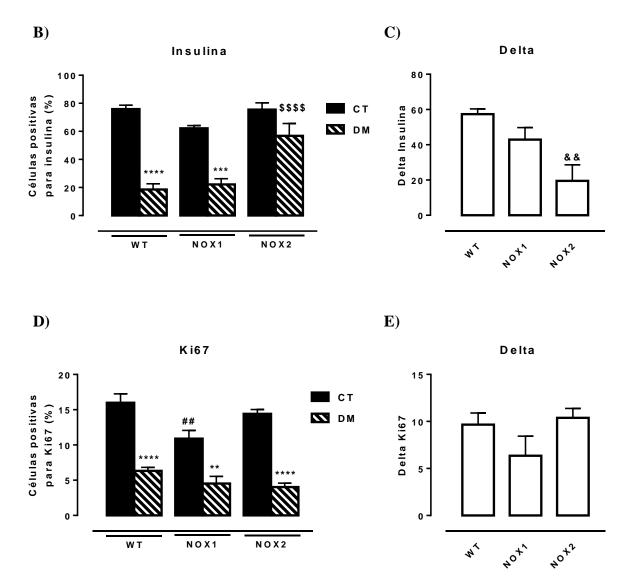
Em relação à marcação de insulina, não encontramos diferenças nos animais saudáveis nos diferentes genótipos (figura 38B,C). Como esperado, animais WT DM apresentaram diminuição na marcação de insulina em relação a WT CT, assim como NOX1 KO DM em relação a NOX1 KO CT (figura 38B). No entanto, animais NOX2 KO DM mantiveram a mesma porcentagem de marcação de insulina que NOX2 KO CT (figura 38B). Em relação à proliferação celular, a indução do DM levou a uma diminuição da marcação positiva para o marcador nuclear Ki67 em ilhotas WT, indicando menor proliferação celular nessas ilhotas (figura 38D). Este efeito também foi observado em ilhotas NOX1 KO DM e NOX2 KO DM comparadas aos seus respectivos controles saudáveis (figura 38D). No entanto, NOX1 KO CT apresentam menor marcação de Ki67 em relação a WT CT (figura 38D), indicando que a perda de NOX1 poderia prejudicar a proliferação celular nas ilhotas. Portanto, a queda no delta Ki67 no grupo NOX1 KO, em comparação com os grupos WT e NOX2 KO, não se refere a um aumento na proliferação, mas sim porque a proliferação na condição controle (NOX1 KO CT) já era menor que no WT (figura 38E).

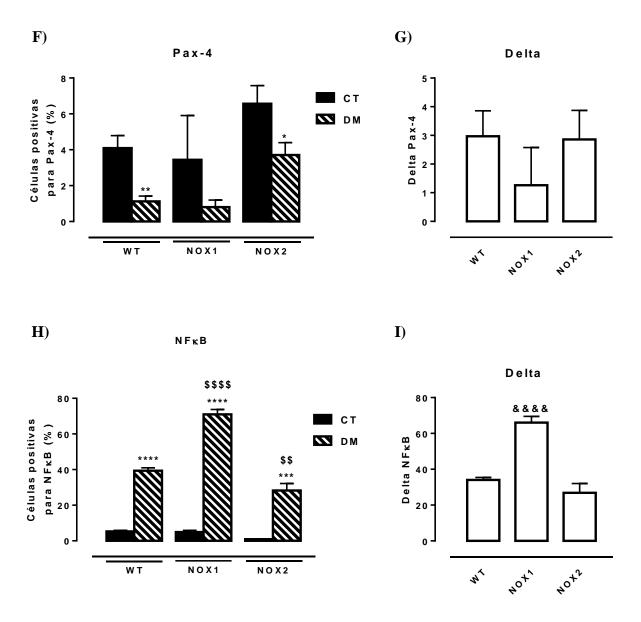
A marcação com Pax-4 apresentou-se diminuída pela indução do DM em todos os genótipos, no entanto a porcentagem de células positivas para Pax-4 em ilhotas NOX2 KO DM foi similar às ilhotas WT CT (figura 38F). Isto deve ocorrer devido a uma tendência da marcação de Pax-4 nas ilhotas NOX2 KO ser maior do que nas ilhotas WT, tanto em animais controle como diabéticos, e não devido a uma proteção contra o tratamento MLDZ. Isto é corroborado pelo delta Pax-4 similar entre os grupos (figura 38G).

A indução do DM levou a aumento da marcação nuclear com NFκB p65, o que indica sua ativação nas células das ilhotas de animais diabéticos, em todos os genótipos (figura 38H). Nas ilhotas NOX1 KO DM este aumento foi maior comparado às ilhotas WT DM (figura 38H,I). Embora as ilhotas NOX2 KO CT apresentaram diminuição de marcação com NFκB p65 em relação às ilhotas WT CT (figura 38H), o aumento induzido pelo DM foi similar entre ambos os grupos (figura 38I).

Figura 38 – Imunomarcação de ilhotas de animais C57BL/6J WT, NOX1 KO e NOX2 KO após indução de DM1 por MLDZ.







A imunomarcação foi feita nas ilhotas dos animais divididos entre saudáveis (CT) (barras pretas) e diabéticos (DM) (barras tracejadas) com anti-insulina, anti-Ki67, anti-Pax-4 e anti-NFκB p65. A) Imagens representativas. Barra de escala: 50 μm. B) Células positivas para insulina (%). C) Delta de B. D) Células positivas para Ki67 (%). E) Delta de D. F) Células positivas para Pax-4 (%). G) Delta de F. H) Células positivas para NFκB p65 (%). I) Delta de H. Os resultados foram expressos como média ± SEM de 5 animais por grupo. B,D,F,H) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001 quando comparado com o respectivo controle saudável no mesmo genótipo (Teste t de Student); ##p<0,01 quando comparado com WT CT e \$\$p<0,01 e \$\$\$p<0,0001 quando comparado com WT DM (Two-way ANOVA + Tukey). C,E,G,I) &&p<0,01 e &&&&p<0,0001 quando comparado com WT (One-way ANOVA + Dunnett).

A formação das células beta pancreáticas ocorre principalmente antes do nascimento e sua expansão mais rápida, durante a fase final da gestação (235). Sabe-se que a capacidade de replicação basal das células beta diminui continuamente, desde o início da idade adulta (236). Por isso, as células beta pancreáticas são tradicionalmente vistas como uma população de células quiescentes, que não sofrem expansão. No entanto, muitas evidências recentes indicam que a massa de células beta é regulada dinamicamente, com regeneração contínua ao longo da vida para reabastecer células beta perdidas ou danificadas (237). Alguns grupos já mostraram que a expansão e regeneração adaptativa da massa de células beta são possíveis após o desenvolvimento de DM1 (237-240).

O reabastecimento da massa de células beta pode, portanto, ocorrer pela proliferação e diferenciação de células-tronco, pela proliferação de células beta pancreáticas e pela transdiferenciação de outras células pancreáticas endócrinas em células beta (241). Por exemplo, foi reportada a recuperação espontânea de camundongos diabéticos pela proliferação aumentada de células beta remanescentes (239, 240). De fato, Dor e colaboradores mostraram que a principal fonte de novas células beta durante a vida adulta parecem ser células beta pré-existentes, muito mais do que células-tronco, sugerindo que as células beta diferenciadas retém uma capacidade proliferativa significativa (242).

Há ainda controvérsias em relação ao papel das EROs na diferenciação e proliferação das células beta. Já foi descrito que pequenas quantidades de EROs produzidas pela NOX, especificamente NOX4, parecem ser cruciais para a formação das células beta em neonatos, atuando como segundo-mensageiros na modificação redox de fatores de transcrição essenciais para a diferenciação (243). No entanto, apesar da NOX4 ser importante para a diferenciação das células beta, grandes quantidades de EROs são inibidoras da proliferação de células beta (244), além de serem deletérias para a função, como já discutido anteriormente. No nosso modelo, os animais KO para NOX1 ou NOX2 ainda expressam a NOX4 em suas ilhotas, o que não comprometeu a formação das células beta ainda no período neonato. Porém, observamos, ainda no controle, que os animais NOX1 KO possuem uma menor marcação de Ki67, mostrando que além de NOX4, NOX1 também possa ser importante para a proliferação.

O fator de transcrição Pax-4 é expresso principalmente no pâncreas endócrino, onde desempenha um papel essencial na indução da diferenciação das células beta (245). Durante o desenvolvimento, os fatores de transcrição Arx e Pax-4 são cruciais para definir o destino das células endócrinas, de maneira que na ausência de Arx, o fenótipo beta é favorecido, enquanto

na ausência de Pax-4, a formação de células alfa é favorecida (246). Recentemente, foram relatadas mutações do gene de Pax-4 associadas ao DM2 (247). Em ilhotas pancreáticas adultas, o Pax-4 tem sido implicado na plasticidade das células beta. Por exemplo, a superexpressão do Pax-4 em ilhotas murinas ou humanas aumentou a proliferação de células beta, além de protegê-las da apoptose induzida por STZ (248) ou por citocinas pró-inflamatórias (249). Por fim, foi demonstrado que a expressão ectópica de Pax-4 em células alfa promove a transdiferenciação destas células em células beta, restaurando a massa de células beta como uma alternativa para reverter o diabetes em animais (250, 251). Neste sentido, evidências indicam que as células alfa podem funcionar como um novo progenitor de células beta. Vale ressaltar que esta é uma via única na neogênese de células beta no animal adulto, visto que durante a vida embrionária, a neogênese de células beta não possui um intermediário positivo para glucagon (252, 253). Nossos resultados indicam que ilhotas NOX2 KO apresentam uma tendência à diferenciação aumentada de células beta, por marcação aumentada de Pax-4, o que corrobora a maior marcação de insulina encontrada.

O fator de transcrição NFκB parece ser ativado por uma série de estímulos, como hiperglicemia, AGs saturados, EROs e citocinas pró-inflamatórias. Ele é importante no controle da regulação de várias vias inflamatórias e apoptose nas células beta pancreáticas (69, 81). No contexto do DM1, o NFκB é sabidamente ativado após a ligação de IL-1β ao seu receptor específico na membrana das células beta e está envolvido na indução da morte dessas células por citocinas pró-inflamatórias (254). Estudos anteriores mostram que a NOX2 e o receptor de IL-1β estão co-localizados em *lipid rafts* e que a inibição da formação de *lipid rafts* reduz a ativação de NFκB mediada por IL-1β (209). Este resultado pode corroborar a menor marcação de NFκB p65 em ilhotas NOX2 KO, tanto na condição controle como após indução de DM1. Além disso, especulamos que na ausência de NOX1 possa haver uma expressão aumentada de NOX2 de maneira compensatória, o que favorece uma expressão aumentada de NFκB p65 em ilhotas de animais NOX1 KO diabéticos. Porém mais experimentos seriam necessários para explorar melhor este achado.

Em seguida, iniciamos experimentos que mimetizam o DM2 pela incubação prolongada das ilhotas pancreáticas com ácido palmítico.

5.9 Variações temporais nos níveis de H_2O_2 citosólico/nuclear ou mitocondrial e de NAD(P)H em ilhotas pancreáticas induzidas por ácido palmítico

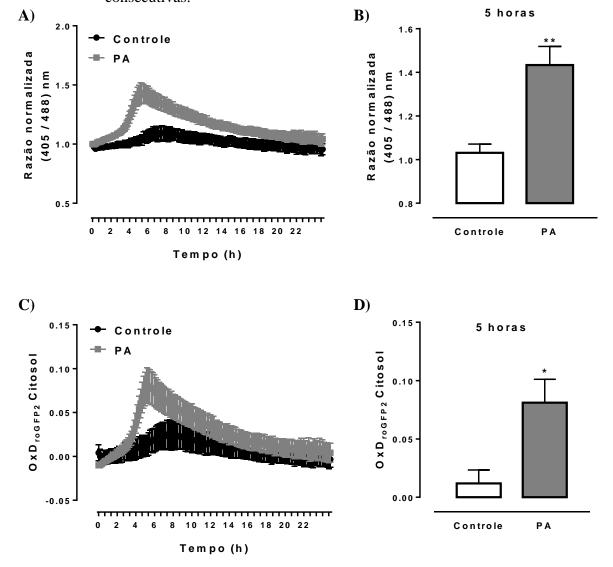
AGs saturados, como o ácido palmítico, particularmente em altas concentrações e/ou em exposições crônicas, estão envolvidos com o aumento na produção de EROs em células beta pancreáticas (167, 176, 255-257). Os AGs saturados são importantes gatilhos para a disfunção e morte das células beta pancreáticas e seus efeitos deletérios são conhecidos como lipotoxicidade, envolvida no desenvolvimento do DM2 (69, 104, 257-263). Durante a lipotoxicidade, a produção prolongada de EROs pode eventualmente levar ao estresse oxidativo, culminando em morte celular. No entanto, a dinâmica de produção de EROs e as fontes intracelulares de EROs após exposição crônica ao ácido palmítico, bem como a importância das EROs para a falência das células beta pancreáticas frente ao ácido palmítico, não são claras.

Em estudo anterior, mudanças nos níveis de H₂O₂ foram medidos com o sensor de H₂O₂ geneticamente codificado, HyPer, direcionado tanto para os peroxissomos, como para a matriz mitocondrial de células RINm5F e ilhotas de rato (264). Eles reportaram um aumento nos níveis de H₂O₂ peroxissomal e um pequeno aumento nos níveis de H₂O₂ na matriz mitocondrial após 24 horas de exposição ao ácido palmítico. Além disso, os níveis de H₂O₂ nos peroxissomos e na matriz mitocondrial foram resgatados pela superexpressão de catalase tanto no citosol como nos peroxissomos, sugerindo que os locais mais prováveis de produção de H₂O₂ frente à exposição ao ácido palmítico sejam os peroxissomos e/ou o citosol (264).

Nós inicialmente monitoramos a produção temporal de H₂O₂ citosólico/nuclear e mitocondrial em resposta ao ácido palmítico, em ilhotas isoladas de camundongos roGFP2-Orp1 e mito-roGFP2-Orp1, respectivamente. A fluorescência em resposta à oxidação do roGFP2-Orp1 foi captada a cada 10 minutos por 24 horas, refletindo a produção de H₂O₂, assim como descrito no item 5.1.2. De maneira interessante, nós observamos um pico transiente na produção de H₂O₂ citosólico/nuclear, em aproximadamente 4-5 horas de exposição ao ácido palmítico, retornando aos níveis do controle após aproximadamente 12 horas (figura 39A-B). Resultados similares foram obtidos através do cálculo da razão (405/488 nm) e do OxD_{roGFP2} (figura 39A-D). Ao mesmo tempo em que observamos um

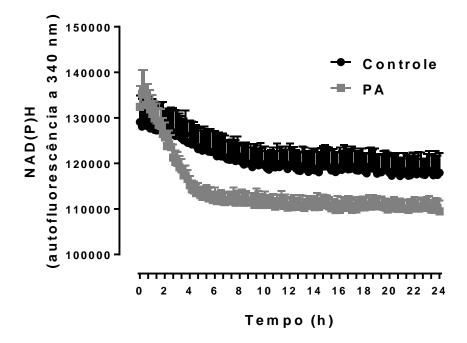
aumento da produção de H₂O₂, também monitoramos os níveis de NAD(P)H, através da autofluorescência do NAD(P)H. O tratamento com ácido palmítico levou a uma diminuição dos níveis de NAD(P)H simultaneamente ao aumento da produção de H₂O₂ citosólico/nuclear (figura 40). No entanto, em contraste com a recuperação dos níveis de H₂O₂ observados, os níveis de NAD(P)H não se recuperaram no período de 24 horas de nossas medições.

Figura 39 – Variações em tempo real dos níveis de H₂O₂ citosólico/nuclear em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6J que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 no citosol/núcleo foram expostas por 24 horas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose. A) Produção de H_2O_2 citosólico/nuclear por 24 horas, representada pela razão 405/488 nm. B) Quantificação de A em 5 horas. C) Produção de H_2O_2 citosólico/nuclear por 24 horas, representada pelo OxD_{roGFP2} . D) Quantificação de C em 5 horas. A intensidade de fluorescência foi captada em leitor de placa a cada 10 minutos por 24 horas consecutivas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=3-4 com três replicatas por condição em cada experimento. *p<0,05 e **p<0,01 quando comparado com a condição controle. Teste t de Student.

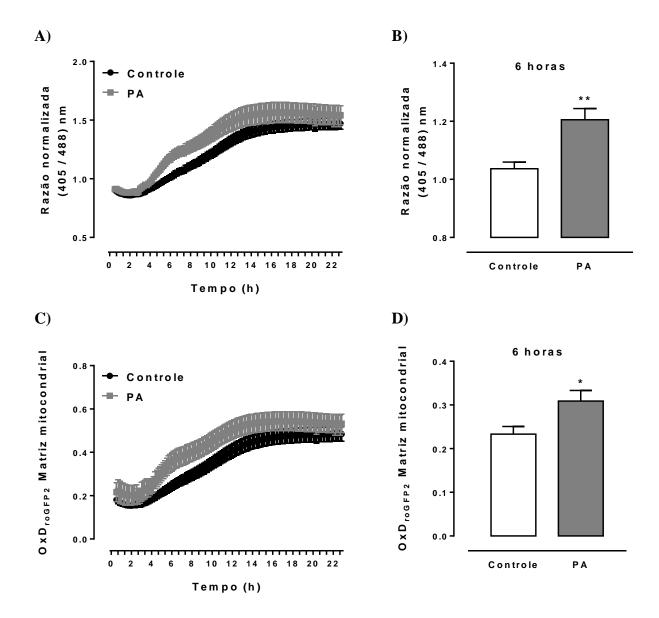
Figura 40 – Variações em tempo real dos níveis de NAD(P)H em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6J que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 no citosol/núcleo foram expostas por 24 horas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose. Os níveis de NAD(P)H foram detectados a partir de sua autofluorescência captada em leitor de placa a cada 10 minutos por 24 horas consecutivas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=3-4 com três replicatas por condição em cada experimento.

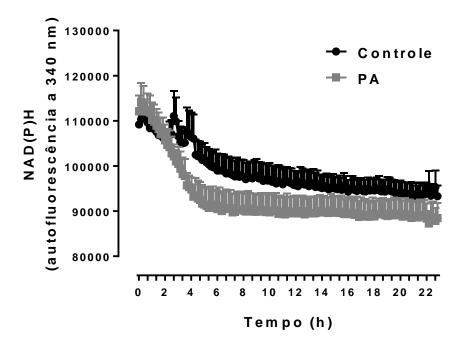
Em contraste, observamos um contínuo aumento na oxidação das ilhotas mitoroGFP2-Orp1 tanto no controle, como nas ilhotas expostas ao ácido palmítico (figura 41A-B). No entanto, consistente com a resposta citosólica/nuclear, houve um aumento significativo na oxidação da sonda em relação ao controle entre 4 e 10 horas após a exposição ao ácido palmítico, com um pico máximo em aproximadamente 6 horas (figura 41A-B), com variações similares tanto na razão (405/488 nm), como no OxD_{roGFP2} (figura 41C-D). Por fim, assim como nas ilhotas roGFP2-Orp1, a exposição ao ácido palmítico levou a uma diminuição dos níveis de NAD(P)H simultaneamente ao aumento da produção de H₂O₂ também nas ilhotas mito-roGFP2-Orp1 (figura 42).

Figura 41 – Variações em tempo real dos níveis de H₂O₂ mitocondrial em ilhotas de camundongos mito-roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6N que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 na matriz mitocondrial foram expostas por 24 horas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose. A) Produção de H₂O₂ mitocondrial por 24 horas, representada pela razão 405/488 nm. B) Quantificação de A em 6 horas. C) Produção de H₂O₂ mitocondrial por 24 horas, representada pelo OxD_{roGFP2}. D) Quantificação de C em 6 horas. A intensidade de fluorescência foi captada em leitor de placa a cada 10 minutos por 24 horas consecutivas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=4 com três replicatas por condição em cada experimento. *p<0,05 e **p<0,01 quando comparado com a condição controle. Teste t de Student.

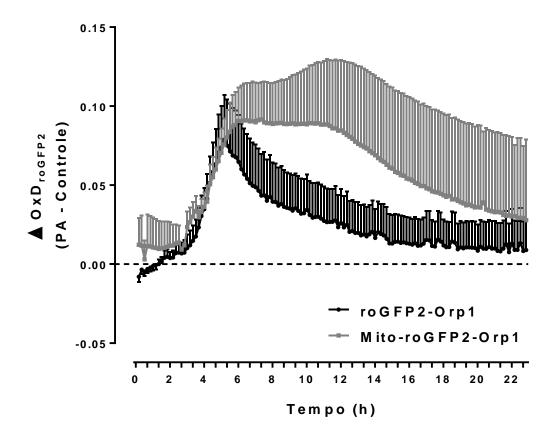
Figura 42 – Variações em tempo real dos níveis de NAD(P)H em ilhotas de camundongos mito-roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6N que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 na matriz mitocondrial foram expostas por 24 horas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose. Os níveis de NAD(P)H foram detectados a partir de sua autofluorescência captada em leitor de placa a cada 10 minutos por 24 horas consecutivas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=4 com três replicatas por condição em cada experimento.

As mudanças dinâmicas observadas e a correlação entre a produção de H_2O_2 citosólica/nuclear e mitocondrial poderiam ser perdidas em outros estudos estáticos (endpoint). Mostramos, portanto pela primeira vez a dinâmica de produção temporal de H_2O_2 em ilhotas expostas ao ácido palmítico. A fim de comparar melhor a produção de H_2O_2 entre os diferentes compartimentos, fizemos a construção do gráfico do delta OxD_{roGFP2} (ΔOxD_{roGFP2}), no qual subtraímos os valores referentes à condição ácido palmítico da condição controle para cada experimento (figura 43). No citosol/núcleo reportamos uma produção transiente, com início entre 4 a 5 horas, com pico máximo em 5 horas e retorno aos níveis do controle em 12 horas. Na mitocôndria observamos uma produção contínua de H_2O_2 , com início em 4 a 5 horas e pico máximo em aproximadamente 6 horas, antes de retornar aos níveis do controle, embora mais lentamente do que no citosol/núcleo.

Figura 43 – Comparação entre as variações em tempo real dos níveis de H₂O₂ mitocondrial e citosólico/nuclear em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 e mito-roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por 24 horas consecutivas.



Ilhotas de camundongos C57BL/6 que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 no citosol/núcleo (roGFP2-Orp1) ou na matriz mitocondrial (Mito-roGFP2-Orp1) foram expostas por 24 horas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose. O ΔOxD_{roGFP2} foi calculado a partir do valor de OxD_{roGFP2} da condição ácido palmítico menos o respectivo valor de OxD_{roGFP2} da condição controle para cada experimento. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=4.

Em suporte às nossas observações, já foi mostrado anteriormente que os níveis do nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) aumentam transitoriamente entre 2 a 8 horas após a exposição ao ácido palmítico (265). O NRF2 é um importante regulador da defesa antioxidante celular por aumentar a transcrição de genes envolvidos na defesa antioxidante. O aumento na produção de proteínas antioxidantes após a ativação de NRF2 também pode estar associado ao retorno do H₂O₂ aos níveis do controle após 12 horas (figura 39A-B). Além disso, estudos recentes de transcriptoma em ilhotas humanas expostas ao ácido palmítico em diferentes momentos mostram a indução de proteínas responsivas ao estresse após 4 horas de incubação com ácido palmítico, incluindo metalotioneínas, que após 12 horas retornam aos níveis do controle (266). As metalotioneínas são proteínas ricas em cisteínas conhecidas por participarem da resposta ao estresse oxidativo (267). A metalotioneína MT1A também encontra-se aumentada durante a glicotoxicidade em células beta pancreáticas (268).

5.10 Papel de NOX2 na produção de H_2O_2 induzida por ácido palmítico em ilhotas pancreáticas

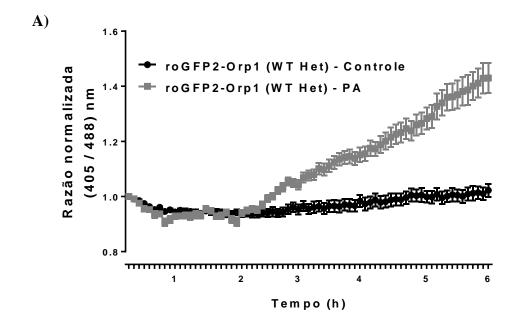
Anteriormente, foi proposto que as mudanças observadas nos níveis de H₂O₂ frente à exposição ao ácido palmítico são principalmente devidas aos peroxissomos e/ou citosol (264). Nossos resultados indicam que os níveis de H₂O₂ aumentam no citosol/núcleo e na matriz mitocondrial em tempos semelhantes após a adição de ácido palmítico em ilhotas isoladas. Estudos anteriores demonstram que o aumento nos níveis de H₂O₂ citosólico rapidamente impacta nos níveis de H₂O₂ na matriz mitocondrial (269, 270). No entanto, o oposto não é válido, ou seja, o H₂O₂ produzido na matriz mitocondrial não parece afetar os níveis de H₂O₂ no citosol (269, 270).

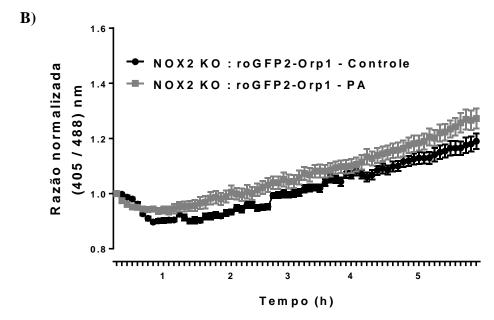
Há várias possíveis fontes de H₂O₂ no citosol e uma delas é o complexo NADPH oxidase. Algumas evidências indicam a participação da NOX na produção de EROs induzida pelo ácido palmítico em células beta pancreáticas. Em ilhotas de rato, 1 hora de exposição ao ácido palmítico levou ao aumento da expressão de mRNA das subunidades p22^{phox}, gp91^{phox} e p47^{phox} (167) e aumento da expressão proteica de p47^{phox} (167, 176), com translocação da p47^{phox} do citosol para a membrana (167). Em células INS 832/13 a exposição ao ácido palmítico por 6 horas levou ao aumento da expressão proteica da p47^{phox}, com ativação da Rac1 (Rac1.GTP) (166). Além disso, o aumento de EROs provocado pelo ácido palmítico foi prevenido: pela inibição da NOX pelo DPI em ilhotas de rato (167), pela inibição da NOX

com apocinina ou por um inibidor seletivo NOX2 (gp91ds-tat) em células INS-1 832/13 (271) e pelo siRNA contra NOX2 em células NIT-1 (184). A partir daí, a fim de confirmar o envolvimento de NOX2 na produção de H₂O₂ no nosso modelo, utilizamos as ilhotas NOX2 KO:roGFP2-Orp1.

Assim como já discutido no item 5.2., devido à menor fluorescência das ilhotas heterozigotas para o sensor, não é possível medir a fluorescência das ilhotas NOX2 KO:roGFP2-Orp1 no leitor de placas utilizado anteriormente (figuras 39-43) e, portanto, a fluorescência foi analisada por microscopia. Nos experimentos com o ácido palmítico, utilizamos duas metodologias. Primeiramente, monitoramos a fluorescência do sensor em tempo real em ilhotas isoladas por um período de 6 horas. Não fizemos análise mais longa, pois diferente do método no leitor de placas, o qual permite robusto controle de temperatura e atmosfera, o microscópio utilizado apenas permite o controle de temperatura, e após 6 horas de medições, percebemos que as ilhotas não estavam mais viáveis. Podemos observar um claro aumento na produção de H₂O₂ em ilhotas controle (WT Het) em aproximadamente 3 a 4 horas de exposição ao ácido palmítico em comparação à condição controle (figura 44A), consistente com nossos resultados anteriores no leitor de placa (figura 39A-B). De maneira interessante, as ilhotas NOX2 KO:roGFP2-Orp1 (NOX2 KO Het) expostas ao ácido palmítico não apresentaram diferenças na produção de H₂O₂ em relação às ilhotas controle (figura 44B), sugerindo o envolvimento de NOX2 na produção de H₂O₂ induzida por ácido palmítico.

Figura 44 – Variações em tempo real dos níveis de H₂O₂ citosólico/nuclear em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 e NOX2 KO:roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por 6 horas consecutivas.

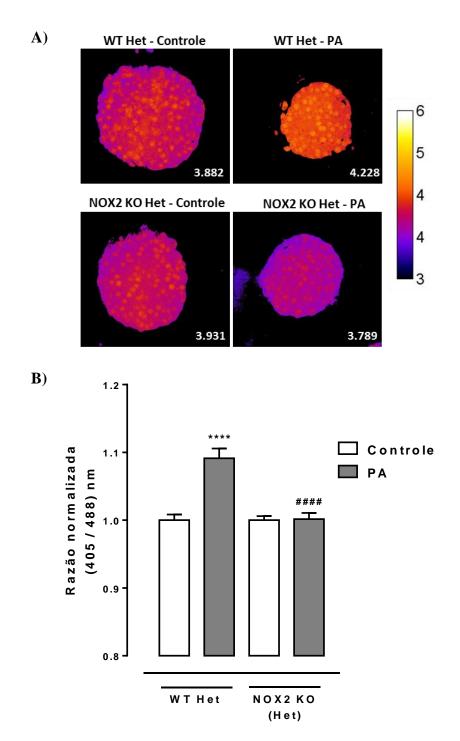




Ilhotas de camundongos C57BL/6J que expressam constitutivamente o sensor redox roGFP2-Orp1 no citosol/núcleo foram expostas por 6 horas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose. As medidas foram expressas como a razão normalizada (405 / 488 nm) das ilhotas de camundongos controle roGFP2-Orp1 heterozigoto (WT Het) (A) ou de camundongos NOX2 KO:roGFP2-Orp1 (B). A intensidade de fluorescência foi captada no microscópio Axio Observer 7. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=3 experimentos independentes.

Como o experimento anterior apresentava a limitação de controle adequado de CO₂ e O₂ durante todo o período de medições, a fim de confirmar os resultados obtidos, utilizamos a mesma metodologia de histologia redox, utilizada anteriormente com as ilhotas NOX2 KO:roGFP2-Orp1 expostas às citocinas pró-inflamatórias (item 5.2). Aqui, as ilhotas foram expostas ao ácido palmítico por 5 horas. A fluorescência das lâminas analisada por microscopia evidenciou, em acordo ao observado nos experimentos dinâmicos no leitor de placa e no microscópio de fluorescência, um aumento na oxidação do sensor, ou seja, maior produção de H₂O₂, nas ilhotas controle expostas ao ácido palmítico, porém sem diferenças nas ilhotas NOX2 KO:roGFP2-Orp1 (NOX2 KO Het) (figura 45A-B). Portanto, a ausência de NOX2 previne contra o aumento de H₂O₂ citosólico/nuclear. Mostramos, então, que o H₂O₂ induzido pelo ácido palmítico em células beta pancreáticas é produzido principalmente no citosol/núcleo, mais especificamente por NOX2, sendo esta uma fonte citosólica crucial de EROs durante a exposição de células beta pancreáticas ao ácido palmítico.

Figura 45 – Produção H₂O₂ citosólico/nuclear em ilhotas de camundongos roGFP2-Orp1 e NOX2KO:roGFP2-Orp1 expostas ao ácido palmítico por 5 horas.



Ilhotas de camundongos controle roGFP2-Orp1 heterozigoto (WT Het) ou NOX2 KO:roGFP2-Orp1 (NOX2 KO Het) foram expostas por 5 horas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose. A) Figuras representativas da oxidação de roGFP2-Orp1 após diferentes condições. Os valores indicam a razão (405/488). B) Produção de H_2O_2 citosólico/nuclear em ilhotas WT Het ou NOX2 KO Het após 5h de exposição ao ácido palmítico. A intensidade de fluorescência foi captada no microscópio Axio Observer 7 e as imagens quantificadas no programa ImageJ Fiji. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. n=3-5 experimentos independentes. ****p<0,0001 quando comparado com o respectivo controle no mesmo genótipo; ####p<0,0001 quando comparado à condição WT Het PA. One-way ANOVA + Tukey.

5.11 Papel de NOX2 na funcionalidade de ilhotas expostas ao ácido palmítico

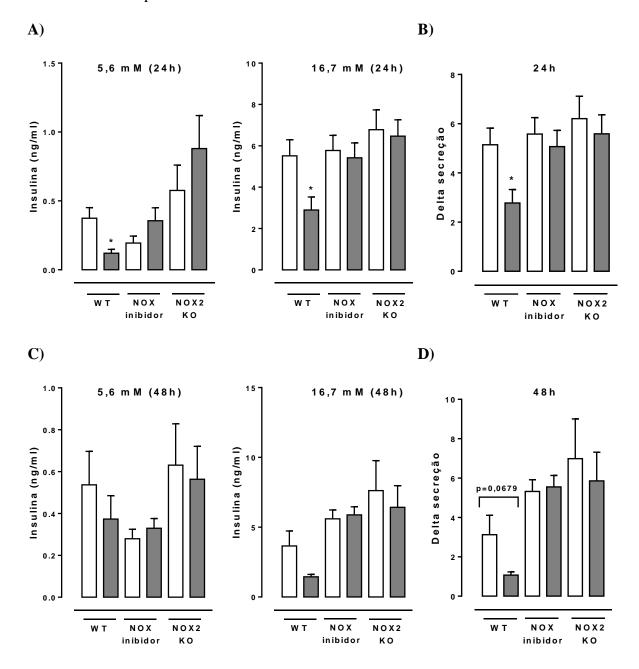
Como os efeitos de exposição crônica ao ácido palmítico estão relacionados à perda de função das células beta pancreáticas, nosso próximo passo foi avaliar o envolvimento da NOX2 na funcionalidade das ilhotas expostas ao ácido palmítico, através da análise da secreção de insulina e da homeostase de cálcio.

5.11.1 Secreção de insulina

Primeiramente, avaliamos a secreção de insulina de ilhotas após exposição ao ácido palmítico por 24 ou 48 horas. Após a incubação, a secreção de insulina em 5,6 ou 16,7 mM de glicose foi analisada. Para testar a participação da NOX, utilizamos duas estratégias: o tratamento de ilhotas WT com o inibidor VAS2870 (não específico a uma isoforma NOX em particular) e a utilização de ilhotas NOX2 KO. Como esperado, o ácido palmítico levou a uma diminuição na secreção de insulina de ilhotas WT após 24 horas de exposição em ambas as concentrações de glicose analisadas (figura 46A) e após 48 horas em alta glicose (figura 46C). Nós também calculamos a resposta à glicose através do delta (valores da secreção de insulina em 16,7 mM de glicose subtraídos dos valores da secreção de insulina em 5,6 mM de glicose). Nós observamos que o tratamento com o ácido palmítico prejudica o aumento concentração-dependente na secreção de insulina tanto em 24 como em 48 horas (figura 46B,D). O prejuízo na secreção de insulina induzido pelo ácido palmítico foi prevenido tanto pela adição simultânea do inibidor VAS2870, como em ilhotas NOX2 KO (figura 46A-D), sugerindo o papel importante da NOX2 como um modulador negativo da secreção de insulina em exposições crônicas ao ácido palmítico.

Alguns estudos anteriores corroboram nossos achados. A disfunção secretória provocada por 24 horas de exposição ao ácido palmítico foi prevenida em ilhotas de camundongo pelo inibidor não específico da NOX (apocinina) associado ao inibidor da iNOS (1400W) (178). A proteção também foi observada em células NIT-1 expostas por 48 horas ao ácido palmítico previamente tratadas com siRNA contra NOX2 (184).

Figura 46 – Secreção de insulina de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas ao ácido palmítico.

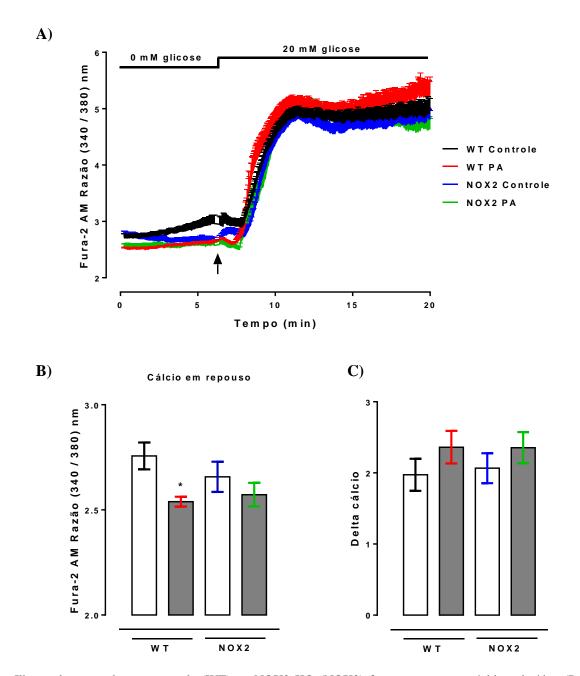


Ilhotas de camundongos controle (WT) e ilhotas NOX2 KO foram expostas ao ácido palmítico (100 μM) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 24 horas (24h) ou 48 horas (48h). Ilhotas WT também foram expostas ao ácido palmítico na ausência ou presença do inibidor da NOX VAS2870 (NOX inibidor). Condição controle sem ácido palmítico (barras brancas); condição com ácido palmítico (barras cinzas). Após o período de incubação, as ilhotas foram incubadas com 5,6 mM ou 16,7 mM de glicose em Krebs Henseleit por 1 hora. A análise da secreção de insulina foi feita por FRET. Os resultados foram expressos como média ± SEM de aproximadamente 10 ilhotas/condição para cada animal, sendo utilizados 5-9 animais por grupo. A) Secreção em 5,6 ou 16,7 mM de glicose após 24 horas de exposição às diferentes condições. B) Delta secreção de 24 horas. C) Secreção em 5,6 ou 16,7 mM de glicose após 48 horas de exposição às diferentes condições. D) Delta secreção de 48 horas. *p<0,05 em relação ao respectivo controle no mesmo genótipo. Teste t de Student.

5.11.2 Homeostase de cálcio

Em seguida, analisamos o papel da NOX2 na dinâmica de cálcio após a exposição ao ácido palmítico. Analisamos o cálcio total e o mecanismo de SOCE em ilhotas expostas ao ácido palmítico por 24 horas. Observamos uma pequena, porém estatística, diminuição no cálcio em repouso, ou seja, antes da adição de glicose, em ilhotas WT previamente expostas ao ácido palmítico quando comparadas com a condição controle (figura 47B). O mesmo não foi observado em ilhotas NOX2 KO (figura 47B), mostrando proteção das ilhotas NOX2 KO frente à perturbação na homeostase de cálcio induzida pelo ácido palmítico. Após adição de 20 mM de glicose, um aumento similar foi observado no cálcio, tanto em ilhotas WT como NOX2 KO, independente de terem sido expostas previamente ao ácido palmítico ou não.

Figura 47 – Dinâmica de cálcio total de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas ao ácido palmítico.

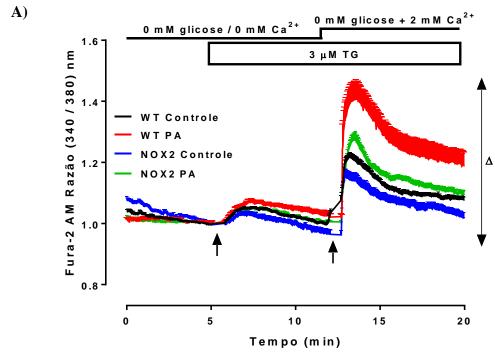


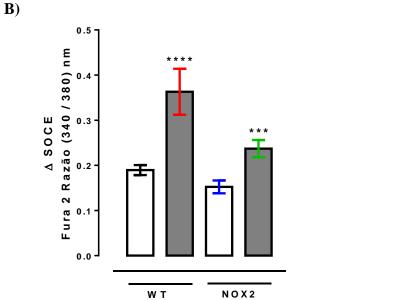
Ilhotas de camundongos controle (WT) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 24 horas. Em seguida, as ilhotas foram incubadas com Fura-2 AM por 2 horas. A análise de fluorescência foi feita no microscópio Axio Observer 7. As ilhotas foram primeiramente incubadas na ausência de glicose (G0), seguida de adição de 20 mM de glicose (G20). A seta indica o momento da adição de glicose. A) Curva de cálcio total. B) Cálcio em repouso. C) Delta, representando a resposta à glicose. O delta foi calculado pelos valores das médias do minuto 11 subtraídos das médias do minuto 7,5. Os resultados foram expressos como média \pm SEM com n=6-11. *p<0,05 em relação ao respectivo controle sem ácido palmítico no mesmo genótipo. Teste t de Student.

É sabido que o ácido palmítico afeta a homeostase do RE e que as EROs podem afetar os níveis de cálcio de RE por modular canais para cálcio (257, 272). Portanto, em seguida nós analisamos o papel da NOX2 no mecanismo SOCE após a exposição das ilhotas ao ácido palmítico por 24 horas. Na ausência de cálcio extracelular, a adição do inibidor da bomba de cálcio SERCA (tapsigargina), levou a um aumento similar no cálcio citosólico tanto nas ilhotas WT, quanto nas ilhotas NOX2 KO, com ou sem exposição prévia ao ácido palmítico (figura 48A). Após adição de 2 mM de cálcio extracelular, as ilhotas WT e NOX2 KO previamente expostas ao ácido palmítico significantemente induziram um influxo de cálcio (figura 48A,B). No entanto, as ilhotas NOX2 KO possuem um influxo de cálcio aparentemente menor, quando comparadas às ilhotas WT (figura 48A,B).

Resultados conflitantes existem a respeito do impacto do ácido palmítico no mecanismo SOCE. Gwiazda e colaboradores mostraram que a exposição aguda a 100 μM de ácido palmítico levou à diminuição dos níveis de cálcio do RE em células MIN6 (220), o que poderia levar ao aumento de SOCE. Em concordância, Ly e colaboradores mostraram que células MIN6 tratadas por 24 horas com 500 μM de ácido palmítico tiveram aumento de SOCE, especialmente em células onde o *pool* de cálcio de RE foi esvaziado (273). Por outro lado, ilhotas de camundongo tratadas com 500 μM de ácido palmítico mostraram diminuição de SOCE após 24 horas (191). No nosso estudo, observamos que o ácido palmítico induziu um aumento de SOCE em ilhotas WT e NOX2 KO, sendo que ilhotas NOX2 KO tiveram um menor SOCE após a exposição ao ácido palmítico quando comparadas às ilhotas WT. Esses dados poderiam indicar que o H₂O₂ citosólico esteja envolvido na regulação do SOCE e/ou níveis de cálcio de RE. Os mecanismos envolvidos ainda não são conhecidos, mas poderiam envolver a modulação de canais para cálcio, como ORAIs, RyR e IP3R pelas EROs (274, 275).

Figura 48 – Mecanismo de entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas ao ácido palmítico.





Ilhotas de camundongos controle (WT) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 24 horas. Em seguida, as ilhotas foram incubadas com Fura-2 AM por 2 horas. A análise de fluorescência foi feita no microscópio Axio Observer 7. As ilhotas foram primeiro expostas a 0 mM de glicose e Ca²⁺, seguida de adição de 3 μ M de tapsigargina (TG) e por fim adição de 2 mM de Ca²⁺. A) Curva do SOCE. B) Delta SOCE. O delta foi calculado pelos valores das médias do minuto 13,5 subtraídas das médias do minuto 12,5. As setas indicam o momento de adição das diferentes condições. Os resultados foram expressos como média \pm SEM com n=8-27 ilhotas. ***p<0,001 e ****p<0,0001 em relação ao respectivo controle sem ácido palmítico no mesmo genótipo. Teste t de Student.

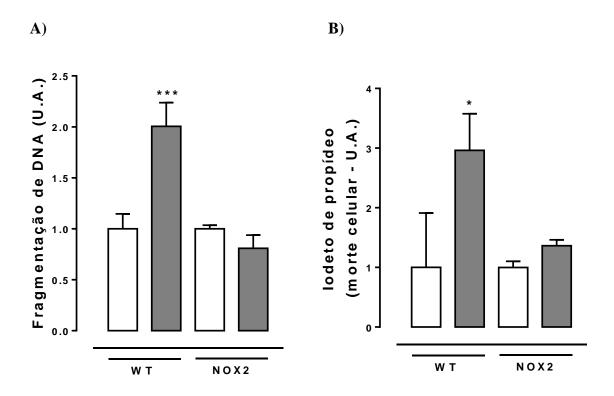
5.12 Papel de NOX2 na viabilidade de ilhotas expostas ao ácido palmítico

A lipotoxicidade induzida pelo ácido palmítico sabidamente leva à apoptose das células beta pancreáticas e esse efeito pode estar envolvido com a geração de EROs pela NOX (104, 263). Portanto, testamos em seguida a apoptose de ilhotas WT e NOX2 KO expostas ao ácido palmítico por 48 horas. Utilizamos dois protocolos: i) a detecção de fragmentação de DNA por ELISA e ii) a marcação com iodeto de propídeo para monitorar a morte celular por citometria de fluxo.

Através da análise de fragmentação de DNA como um marcador de apoptose celular, observamos um aumento esperado na apoptose induzida pelo ácido palmítico em ilhotas WT (figura 49A). Em contraste, ilhotas NOX2 KO foram protegidas da indução de apoptose pelo ácido palmítico (figura 49A). Para confirmar este efeito, utilizamos a marcação com iodeto de propídeo, marcador de apoptose tardia e necrose, por citometria de fluxo. Observamos novamente o esperado aumento na apoptose em ilhotas WT expostas ao ácido palmítico e proteção em ilhotas NOX2 KO (figura 49B). Nossos resultados, portanto, indicam a participação de NOX2 na perda de viabilidade durante a exposição crônica ao ácido palmítico.

Alguns estudos anteriores corroboram nossos resultados. A inibição da NOX atenuou a indução de morte celular pelo ácido palmítico em ilhotas humanas pelo inibidor da NOX2 (Phox-I2) e pelo inibidor da NOX4 (GLX7013114) (160) e em células NIT-1 pelo siRNA contra NOX2 (184).

Figura 49 – Viabilidade celular de ilhotas de camundongos WT e NOX2 KO expostas ao ácido palmítico.



Ilhotas de camundongos controle (WT) ou NOX2 KO (NOX2) foram expostas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 48 horas. A análise de viabilidade celular foi feita após dispersão das células das ilhotas com tripsina. A) A análise de fragmentação de DNA foi feita pela absorbância em 405 nm após utilização do kit ELISA Cell Death Detection. B) A análise de fluorescência foi feita por citometria de fluxo após utilização do FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de aproximadamente 50 ilhotas/condição para cada animal em A e aproximadamente 30 ilhotas/condição para cada animal em B. A) n=6 para WT, n=5-6 para NOX2. B) n=3-4 para WT e n=4 para NOX2. *p<0,05 e ***p<0,001 em relação ao respectivo controle sem ácido palmítico no mesmo genótipo. One-Way ANOVA + Sidak.

5.13 Papel de NOX no estresse de RE de células beta pancreáticas expostas ao ácido palmítico

Por fim, sabemos que o ácido palmítico leva ao distúrbio na homeostase do RE em células beta pancreáticas, o que pode culminar na morte celular (104, 107). Como já discutido anteriormente, um possível *crosstalk* entre a ativação da NOX e do estresse de RE já foi reportado em outros tipos celulares, como macrófagos (225), cardiomiócitos (223, 276) e neutrófilos (224). Porém, em células beta pancreáticas não existem evidências até o momento. Notamos que o pico de H₂O₂ citosólico/nuclear (5 horas / figuras 39A,B e 44A) ocorre logo antes da ativação de proteínas do estresse de RE induzida pelo ácido palmítico (107), sugerindo que o H₂O₂ poderia estar envolvido nos eventos de sinalização, culminando com a ativação do estresse de RE. Portanto, em seguida, nos perguntamos se a proteção na morte celular pela inibição da NOX2 em ilhotas expostas ao ácido palmítico poderia ser devido ao impacto no estresse de RE.

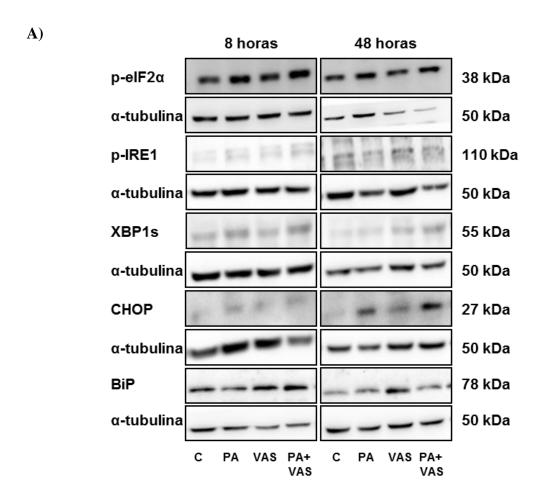
Para testar esta hipótese, utilizamos a linhagem de células beta BRIN-BD11 ao invés de ilhotas, devido à grande quantidade de material necessário para o protocolo de western blot. As células BRIN-BD11 foram expostas ao ácido palmítico na presença ou ausência do inibidor da NOX VAS2870. Posteriormente, analisamos a expressão proteica de marcadores do estresse de RE, dos dois principais eixos da UPR: PERK/eIF2α/ATF4/CHOP e IRE1/XBP1 (figura 50A).

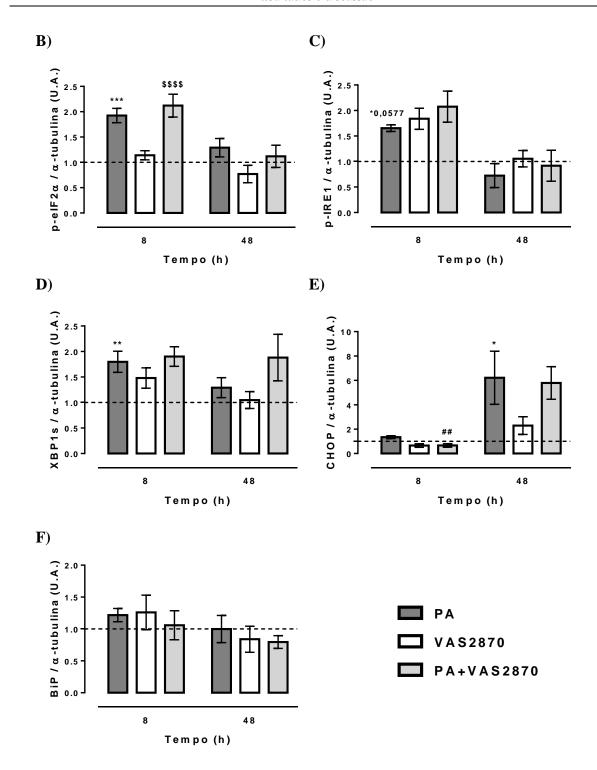
Como esperado, 8 horas de exposição ao ácido palmítico levou ao aumento na expressão das proteínas p-eIF2α (figura 50A,B), p-IRE1 (figura 50A,C) e XBP1s (figura 50A,D) comparadas à condição controle. Após 48 horas de exposição ao ácido palmítico, apenas os níveis de CHOP permaneceram significativamente aumentados (figura 50A,E). Não observamos alteração na expressão proteica de BiP em nenhum dos dois tempos de incubação avaliados (figura 50A,F).

A inibição da NOX com VAS2870 não provocou efeito nos níveis de p-eIF2α, p-IRE1 ou XBP1s em resposta ao ácido palmítico (figura 50A–D). Nós observamos que VAS2870 teve um pequeno efeito protetivo na indução de CHOP pelo ácido palmítico em 8 horas, efeito perdido em 48 horas (figura 50A,E). Além do efeito protetivo ser pequeno, o aumento nos níveis de CHOP representa o estresse celular de maneira geral e não é necessariamente exclusivo do estresse de RE (277, 278). Assim, o papel de VAS2870 na prevenção de um aumento precoce de CHOP após a exposição ao ácido palmítico pode ser devido à atenuação

do H₂O₂ citosólico e não devido à prevenção do estresse de RE. Portanto, nossos resultados indicam que a indução do estresse de RE pelo ácido palmítico deva ser independente da NOX, em contraste com os efeitos na secreção de insulina e na homeostase de cálcio.

Figura 50 – Expressão proteica de marcadores do estresse de retículo em células BRIN-BD11 expostas ao ácido palmítico na ausência ou presença de inibidor da NOX.





Células BRIN-BD11 foram expostas ao ácido palmítico (PA) (100 μ M) na ausência ou presença de 10 μ M do inibidor da NOX VAS2870 (VAS) em meio RPMI com 10 mM de glicose por 8 ou 48 horas. A) figura representativa de 4-8 experimentos independentes para as proteínas p-eIF2 α , p-IRE1, XBP1s, CHOP e BiP. B-F) gráficos com a quantificação das bandas específicas das proteínas p-eIF2 α (B), p-IRE1 (C), XBP1s (D), CHOP (E) e BiP (F) e corrigidas pelos valores correspondentes à α -tubulina mostrado como média \pm SEM. A linha tracejada representa o controle sem tratamento. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado ao controle sem tratamento no mesmo tempo de incubação; ##p<0,01 quando comparado à condição PA no mesmo tempo de incubação; \$\$\$\$p<0,0001 quando comparado à condição VAS no mesmo tempo de incubação. One-way ANOVA + Sidak. U.A. – unidades arbitrárias.

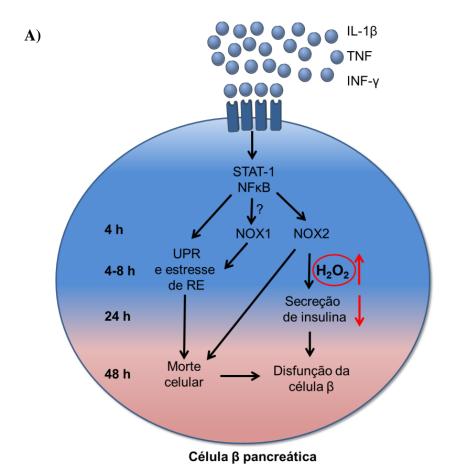
6 CONCLUSÕES

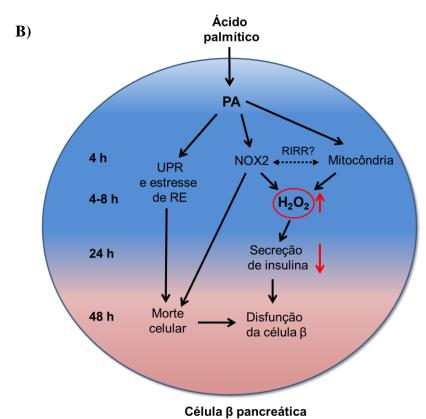
Utilizamos pela primeira vez um sensor redox específico para avaliar o efeito temporal na produção de H₂O₂ em ilhotas pancreáticas expostas a condições que mimetizam o DM1 e o DM2. No caso do DM1, a comparação entre diferentes compartimentos mostrou que o citosol/núcleo, mais especificamente NOX2, apresenta papel principal na produção de H₂O₂ induzida por citocinas em ilhotas pancreáticas. Mostramos também que a ausência de NOX2 confere melhor tolerância à glicose e protege as ilhotas da disfunção secretória associada à exposição às citocinas pró-inflamatórias. Apesar da ausência de NOX2 levar a uma perturbação da homeostase de cálcio total, ela aparentemente não afeta o cálcio de RE. Mostramos o envolvimento de NOX1, e não de NOX2, na ativação do estresse de RE provocado pelas citocinas pró-inflamatórias. Porém, ambas as isoformas estão envolvidas na perda de viabilidade induzida por citocinas. Ilhotas NOX2 KO de animais diabéticos foram protegidas de alguns parâmetros deletérios encontrados normalmente no desenvolvimento de diabetes, como a diminuição na circularidade e a diminuição da marcação de insulina.

No caso do DM2, mostramos pela primeira vez que a exposição de ilhotas ao ácido palmítico leva a um aumento transiente de H₂O₂ citosólico/nuclear e um aumento contínuo de H₂O₂ mitocondrial. O aumento de H₂O₂ citosólico/nuclear foi completamente prevenido pela ausência de NOX2. A ausência de NOX2 também preveniu contra os efeitos deletérios do ácido palmítico na secreção de insulina, na homeostase de cálcio total e viabilidade. Ilhotas NOX2 KO tiveram um menor SOCE após a exposição ao ácido palmítico em relação às ilhotas WT, indicando que o H₂O₂ citosólico/nuclear possa estar envolvido na regulação do SOCE e/ou níveis de cálcio de RE. No entanto, não observamos impacto da NOX na indução do estresse de RE induzido pelo ácido palmítico.

A importância das EROs produzidas por NOXs parece ser bastante complexa, já que são ao mesmo tempo importantes para funcionalidade, mas também relacionadas a efeitos deletérios nas células. O balanço entre a produção e a detoxificação dessas espécies é fundamental para adequado equilíbrio. Como as EROs são produzidas e rapidamente removidas pelo sistema antioxidante, para que possamos desenvolver formas de modular a produção/remoção dessas EROs, é fundamental o conhecimento sobre o seu local de produção. Finalmente, propomos que a inibição da NOX2 pode funcionar como uma terapia potencial contra a disfunção precoce de células beta induzida por citocinas pró-inflamatórias e AGs no contexto do DM1 e do DM2.

Figura 51 – Mecanismo proposto para a indução de disfunção da célula beta no DM1 e DM2.





A) No modelo de DM1, as citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a insulite ativam receptores específicos, localizados na membrana das células beta pancreáticas, levando à ativação dos fatores de transcrição STAT-1 e NFκB. A partir de 4 horas após a exposição às citocinas, ocorre um aumento transiente de H₂O₂ no citosol, via NOX2. B) No modelo de DM2, o ácido palmítico entra na célula beta pancreática e aumenta a produção de H₂O₂ via NOX2 de maneira transiente, também a partir de 4 horas após a exposição ao ácido palmítico. Em paralelo, o ácido palmítico é transportado para a mitocôndria, onde é oxidado, levando à geração de H₂O₂. A ativação da NOX2 e da mitocôndria pode levar a um mecanismo de feedback positivo, conhecido como liberação de EROs induzida por EROs (RIRR). A,B) A ativação precoce de NOX2 em ambos os modelos, e o consequente aumento de H₂O₂, atua como modulador negativo da secreção de insulina em tempos subsequentes (24 horas). Após ~4-8 horas, o ácido palmítico e as citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão de proteínas envolvidas na UPR. A ativação da UPR tem o objetivo de restaurar a homeostase do retículo endoplasmático (ER), porém quando muito severa ou prolongada, pode ser prejudicial para a função e viabilidade das células. A ativação do estresse de RE parece ser independente da ativação da NOX2.

REFERÊNCIAS*

- 1. Henry BM, Skinningsrud B, Saganiak K, Pękala PA, Walocha JA, Tomaszewski KA. Development of the human pancreas and its vasculature An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. Ann Anat. 2019;221:115-24.
- 2. Ceranowicz P, Cieszkowski J, Warzecha Z, Kuśnierz-Cabala B, Dembiński A. The Beginnings of Pancreatology as a Field of Experimental and Clinical Medicine. Biomed Res Int. 2015;2015:128095.
- 3. Lind M, Svensson AM, Kosiborod M, Gudbjörnsdottir S, Pivodic A, Wedel H, et al. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. N Engl J Med. 2014;371(21):1972-82.
- 4. Harding JL, Shaw JE, Peeters A, Guiver T, Davidson S, Magliano DJ. Mortality trends among people with type 1 and type 2 diabetes in Australia: 1997-2010. Diabetes Care. 2014;37(9):2579-86.
- 5. Dell'Aquila E, Fulgenzi CAM, Minelli A, Citarella F, Stellato M, Pantano F, et al. Prognostic and predictive factors in pancreatic cancer. Oncotarget. 2020;11(10):924-41.
- 6. Bracco PA, Gregg EW, Rolka DB, Schmidt MI, Barreto SM, Lotufo PA, et al. A nationwide analysis of the excess death attributable to diabetes in Brazil. J Glob Health. 2020;10(1):010401.
- 7. Hegyi P, Petersen OH. The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2013;165:1-30.
- 8. Da Silva Xavier G. The Cells of the Islets of Langerhans. J Clin Med. 2018;7(3).
- 9. Ionescu-Tirgoviste C, Gagniuc PA, Gubceac E, Mardare L, Popescu I, Dima S, et al. A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. Sci Rep. 2015;5:14634.
- 10. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. J Histochem Cytochem. 2005;53(9):1087-97.
- 11. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(7):2334-9.
- 12. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. Endocr Rev. 2007;28(1):84-116.
- 13. Weir GC, Bonner-Weir S. Pancreatic somatostatin. Adv Exp Med Biol. 1985;188:403-23.
- 14. Lonovics J, Devitt P, Watson LC, Rayford PL, Thompson JC. Pancreatic polypeptide. A review. Arch Surg. 1981;116(10):1256-64.
- 15. Sakata N, Yoshimatsu G, Kodama S. Development and Characteristics of Pancreatic Epsilon Cells. Int J Mol Sci. 2019;20(8).
- 16. Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. Islets. 2009;1(2):129-36.
- 17. Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. Islets. 2010;2(3):135-45.
- 18. Arrojo e Drigo R, Ali Y, Diez J, Srinivasan DK, Berggren PO, Boehm BO. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. Diabetologia. 2015;58(10):2218-28.
- 19. Stagner JI, Samols E. The vascular order of islet cellular perfusion in the human pancreas. Diabetes. 1992;41(1):93-7.
- 20. Nyman LR, Wells KS, Head WS, McCaughey M, Ford E, Brissova M, et al. Real-time, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets. J Clin Invest. 2008;118(11):3790-7.
- 21. Liu M, Weiss MA, Arunagiri A, Yong J, Rege N, Sun J, et al. Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. Diabetes Obes Metab. 2018;20 Suppl 2:28-50.
- 22. Boron WF, Boulpaep EL. Medical Physiology. 2nd ed2012. 1352 p.
- 23. Aires MdM. Fisiologia. 4ª ed2012. 1352 p.

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

- 24. Hope SV, Knight BA, Shields BM, Hattersley AT, McDonald TJ, Jones AG. Random non-fasting C-peptide: bringing robust assessment of endogenous insulin secretion to the clinic. Diabet Med. 2016;33(11):1554-8.
- 25. Wang Y, Gao Y, Cai X, Chen L, Zhou L, Ma Y, et al. Clinical Implications of Urinary C-Peptide Creatinine Ratio in Patients with Different Types of Diabetes. J Diabetes Res. 2019:2019:1747684.
- 26. Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. Metabolic control of beta-cell function. Semin Cell Dev Biol. 2000;11(4):267-75.
- 27. MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005;360(1464):2211-25.
- 28. Newsholme P, Gaudel C, McClenaghan NH. Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity. Adv Exp Med Biol. 2010;654:91-114.
- 29. Rutter GA, Pullen TJ, Hodson DJ, Martinez-Sanchez A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. Biochem J. 2015;466(2):203-18.
- 30. Straub SG, Sharp GW. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. Diabetes Metab Res Rev. 2002;18(6):451-63.
- 31. Tirosh A, Shai I, Tekes-Manova D, Israeli E, Pereg D, Shochat T, et al. Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men. N Engl J Med. 2005;353(14):1454-62.
- 32. Nichols GA, Hillier TA, Brown JB. Normal fasting plasma glucose and risk of type 2 diabetes diagnosis. Am J Med. 2008;121(6):519-24.
- 33. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Med Clin North Am. 2004;88(4):787-835, ix.
- 34. Trexler AJ, Taraska JW. Regulation of insulin exocytosis by calcium-dependent protein kinase C in beta cells. Cell Calcium. 2017;67:1-10.
- 35. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. Physiol Rev. 2018;98(1):117-214.
- 36. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. Diabetes. 2000;49(11):1751-60.
- 37. Henquin JC, Nenquin M, Ravier MA, Szollosi A. Shortcomings of current models of glucose-induced insulin secretion. Diabetes Obes Metab. 2009;11 Suppl 4:168-79.
- 38. Sakuma N, Ishikawa S, Okada K, Miyazaki J, Saito T. Glucose induces calcium-dependent and calcium-independent insulin secretion from the pancreatic beta cell line MIN6. Eur J Endocrinol. 1995;133(2):227-34.
- 39. Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Sharp GW. Glucose stimulation of insulin release in the absence of extracellular Ca2+ and in the absence of any increase in intracellular Ca2+ in rat pancreatic islets. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(23):10728-32.
- 40. Kunau WH, Dommes V, Schulz H. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. Prog Lipid Res. 1995;34(4):267-342.
- 41. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. Annu Rev Nutr. 2001;21:193-230.
- 42. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. Nature. 2003;422(6928):173-6.
- 43. Itoh Y, Hinuma S. GPR40, a free fatty acid receptor on pancreatic beta cells, regulates insulin secretion. Hepatol Res. 2005;33(2):171-3.
- 44. Gravena C, Mathias PC, Ashcroft SJ. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. J Endocrinol. 2002;173(1):73-80.
- 45. Carpinelli AR, Picinato MC, Stevanato E, Oliveira HR, Curi R. Insulin secretion induced by palmitate--a process fully dependent on glucose concentration. Diabetes Metab. 2002;28(6 Pt 2):3S37-44; discussion 3S108-12.
- 46. Deeney JT, Gromada J, Høy M, Olsen HL, Rhodes CJ, Prentki M, et al. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI betacells). J Biol Chem. 2000;275(13):9363-8.

- 47. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. J Biol Chem. 2003;278(13):11303-11.
- 48. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. Nat Med. 2005;11(1):90-4.
- 49. Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. Biochem Biophys Res Commun. 2005;335(1):97-104.
- 50. Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. Biochem Biophys Res Commun. 2003;301(2):406-10.
- 51. Poitout V. The ins and outs of fatty acids on the pancreatic beta cell. Trends Endocrinol Metab. 2003;14(5):201-3.
- 52. Gromada J. The free fatty acid receptor GPR40 generates excitement in pancreatic beta-cells. Endocrinology. 2006;147(2):672-3.
- 53. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. Diabetes. 2006;55 Suppl 2:S16-23.
- 54. Kebede MA, Alquier T, Latour MG, Poitout V. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? Diabetes Obes Metab. 2009;11 Suppl 4:10-20.
- 55. Garrido DM, Corbett DF, Dwornik KA, Goetz AS, Littleton TR, McKeown SC, et al. Synthesis and activity of small molecule GPR40 agonists. Bioorg Med Chem Lett. 2006;16(7):1840-5.
- 56. Bharate SB, Rodge A, Joshi RK, Kaur J, Srinivasan S, Kumar SS, et al. Discovery of diacylphloroglucinols as a new class of GPR40 (FFAR1) agonists. Bioorg Med Chem Lett. 2008;18(24):6357-61.
- 57. Christiansen E, Urban C, Merten N, Liebscher K, Karlsen KK, Hamacher A, et al. Discovery of potent and selective agonists for the free fatty acid receptor 1 (FFA(1)/GPR40), a potential target for the treatment of type II diabetes. J Med Chem. 2008;51(22):7061-4.
- 58. Negoro N, Sasaki S, Mikami S, Ito M, Suzuki M, Tsujihata Y, et al. Discovery of TAK-875: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable GPR40 Agonist. ACS Med Chem Lett. 2010;1(6):290-4.
- 59. Houze JB, Zhu L, Sun Y, Akerman M, Qiu W, Zhang AJ, et al. AMG 837: a potent, orally bioavailable GPR40 agonist. Bioorg Med Chem Lett. 2012;22(2):1267-70.
- 60. Araki T, Hirayama M, Hiroi S, Kaku K. GPR40-induced insulin secretion by the novel agonist TAK-875: first clinical findings in patients with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab. 2012;14(3):271-8.
- 61. Vilas-Boas EA, Karabacz N, Marsiglio-Librais GN, Valle MMR, Nalbach L, Ampofo E, et al. Chronic activation of GPR40 does not negatively impact upon BRIN-BD11 pancreatic β -cell physiology and function. Pharmacol Rep. 2020.
- 62. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. Physiol Rev. 2018;98(4):2133-223.
- 63. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(6):383-96.
- 64. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Diabetes Care. 2020;43(Suppl 1):S14-S31.
- 65. King KM, Rubin G. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. Br J Nurs. 2003;12(18):1091-5.
- 66. Sociedade Brasileira de Diabetes 2016 [Available from: www.diabetes.org.br.
- 67. Williams R, Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Basit A, Besançon S, et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract. 2020;162:108072.
- 68. Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β-cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. Nat Rev Endocrinol. 2020.

- 69. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic betacell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. Diabetes. 2005;54 Suppl 2:S97-107.
- 70. Rashid MO, Sheikh A, Salam A, Farooq S, Kiran Z, Islam N. Diabetic ketoacidosis characteristics and differences In type 1 versus type 2 diabetes patients. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2017;29(3):398-402.
- 71. Cardoso S, Santos RX, Correia SC, Carvalho C, Santos MS, Baldeiras I, et al. Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. Neurobiol Dis. 2013;49:1-12.
- 72. Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. Neurochem Int. 2013;63(4):331-43.
- 73. McNay EC, Cotero VE. Mini-review: impact of recurrent hypoglycemia on cognitive and brain function. Physiol Behav. 2010;100(3):234-8.
- 74. Won SJ, Yoo BH, Kauppinen TM, Choi BY, Kim JH, Jang BG, et al. Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats. J Neuroinflammation. 2012:9:182.
- 75. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. Nat Rev Endocrinol. 2009;5(4):219-26.
- 76. Fløyel T, Kaur S, Pociot F. Genes affecting β -cell function in type 1 diabetes. Curr Diab Rep. 2015;15(11):97.
- 77. Pang H, Luo S, Huang G, Xia Y, Xie Z, Zhou Z. Advances in Knowledge of Candidate Genes Acting at the Beta-Cell Level in the Pathogenesis of T1DM. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:119.
- 78. Esposito S, Toni G, Tascini G, Santi E, Berioli MG, Principi N. Environmental Factors Associated With Type 1 Diabetes. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:592.
- 79. Eizirik DL, Darville MI. beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. Diabetes. 2001;50 Suppl 1:S64-9.
- 80. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. Diabetologia. 2001;44(12):2115-33.
- 81. Eizirik DL, Miani M, Cardozo AK. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. Diabetologia. 2013;56(2):234-41.
- 82. Brozzi F, Eizirik DL. ER stress and the decline and fall of pancreatic beta cells in type 1 diabetes. Ups J Med Sci. 2016;121(2):133-9.
- 83. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nat Rev Endocrinol. 2018;14(2):88-98.
- 84. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. Diabetes. 2000;49(12):2201-7.
- 85. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. Cardiol Res Pract. 2014;2014:943162.
- 86. Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, Zhao Y. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. Medicina (Kaunas). 2019;55(9).
- 87. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. J Nutr. 2006;136(4):873-6.
- 88. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. Endocr Rev. 2008;29(3):351-66.
- 89. Nolan CJ, Prentki M. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. Trends Endocrinol Metab. 2008;19(8):285-91.
- 90. Prentki M, Peyot ML, Masiello P, Madiraju SRM. Nutrient-Induced Metabolic Stress, Adaptation, Detoxification, and Toxicity in the Pancreatic β-Cell. Diabetes. 2020;69(3):279-90.
- 91. Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes. J Mol Endocrinol. 2016;56(2):R33-54.
- 92. Steinberg GR. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. Cell Cycle. 2007;6(8):888-94.

- 93. Su SC, Pei D, Hsieh CH, Hsiao FC, Wu CZ, Hung YJ. Circulating pro-inflammatory cytokines and adiponectin in young men with type 2 diabetes. Acta Diabetol. 2011;48(2):113-9.
- 94. Imai Y, Dobrian AD, Morris MA, Nadler JL. Islet inflammation: a unifying target for diabetes treatment? Trends Endocrinol Metab. 2013;24(7):351-60.
- 95. Imai Y, Dobrian AD, Weaver JR, Butcher MJ, Cole BK, Galkina EV, et al. Interaction between cytokines and inflammatory cells in islet dysfunction, insulin resistance and vascular disease. Diabetes Obes Metab. 2013;15 Suppl 3:117-29.
- 96. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. Annu Rev Biochem. 2012;81:767-93.
- 97. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. J Cell Biol. 2012;197(7):857-67.
- 98. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? Antioxid Redox Signal. 2007;9(12):2277-93.
- 99. Fonseca SG, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic β -cell death. Trends Endocrinol Metab. 2011;22(7):266-74.
- 100. Seo J, Lee KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. J Biochem Mol Biol. 2004;37(1):35-44.
- 101. McCaffrey K, Braakman I. Protein quality control at the endoplasmic reticulum. Essays Biochem. 2016;60(2):227-35.
- 102. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. Apoptosis. 2002;7(4):335-45.
- 103. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science. 2004;306(5695):457-61.
- 104. Cnop M, Ladrière L, Igoillo-Esteve M, Moura RF, Cunha DA. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β -cell dysfunction. Diabetes Obes Metab. 2010;12 Suppl 2:76-82.
- 105. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. Endocr Rev. 2008;29(1):42-61.
- 106. Hassler JR, Scheuner DL, Wang S, Han J, Kodali VK, Li P, et al. The IRE1α/XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of β Cells. PLoS Biol. 2015;13(10):e1002277.
- 107. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. J Cell Sci. 2008;121(Pt 14):2308-18.
- 108. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285(6):H2290-7.
- 109. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. Circ Res. 2001;88(1):44-51.
- 110. Babior BM. NADPH oxidase: an update. Blood. 1999;93(5):1464-76.
- 111. Mehmeti I, Lortz S, Lenzen S. The H2O2-sensitive HyPer protein targeted to the endoplasmic reticulum as a mirror of the oxidizing thiol-disulfide milieu. Free Radic Biol Med. 2012;53(7):1451-8.
- 112. Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, del Río LA. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. Subcell Biochem. 2013;69:231-55.
- 113. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol Rev. 2014;94(3):909-50.
- 114. Lenzen S. Chemistry and biology of reactive species with special reference to the antioxidative defence status in pancreatic β -cells. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2017;1861(8):1929-42.
- 115. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. Curr Opin Cell Biol. 2015;33:8-13.
- 116. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020.

- 117. Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. Biomolecules. 2015;5(2):472-84.
- 118. 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.
- 119. 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.
- 120. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. Redox Biol. 2017;11:613-9.
- 121. Lakey JR, Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Korbutt GS, Rajotte RV, Mabley JG, et al. Peroxynitrite is a mediator of cytokine-induced destruction of human pancreatic islet beta cells. Lab Invest. 2001;81(12):1683-92.
- 122. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr Rev. 2002;23(5):599-622.
- 123. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82(1):47-95.
- 124. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 2003;17(10):1195-214.
- 125. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem. 1969;244(22):6049-55.
- 126. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. Cell Signal. 1999;11(1):1-14.
- 127. 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.
- 128. 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.
- 129. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. Diabetes. 1997;46(11):1733-42.
- 130. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. Biochem Soc Trans. 2008;36(Pt 3):343-7.
- 131. Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. Biochem J. 1981;199(2):393-8.
- 132. Modak MA, Parab PB, Ghaskadbi SS. Pancreatic islets are very poor in rectifying oxidative DNA damage. Pancreas. 2009;38(1):23-9.
- 133. Godoy JR, Funke M, Ackermann W, Haunhorst P, Oesteritz S, Capani F, et al. Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. Biochim Biophys Acta. 2011;1810(1):2-92.
- 134. Stancill JS, Broniowska KA, Oleson BJ, Naatz A, Corbett JA. Pancreatic β -cells detoxify H. J Biol Chem. 2019;294(13):4843-53.
- 135. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R, et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. Diabetologia. 2009;52(12):2489-98.
- 136. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. Lancet. 2004;364(9441):1219-28.
- 137. Eidelman RS, Hollar D, Hebert PR, Lamas GA, Hennekens CH. Randomized trials of vitamin E in the treatment and prevention of cardiovascular disease. Arch Intern Med. 2004;164(14):1552-6.
- 138. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. JAMA. 2007;297(8):842-57.
- 139. Gallicchio L, Boyd K, Matanoski G, Tao XG, Chen L, Lam TK, et al. Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. Am J Clin Nutr. 2008;88(2):372-83.
- 140. Dotan Y, Pinchuk I, Lichtenberg D, Leshno M. Decision analysis supports the paradigm that indiscriminate supplementation of vitamin E does more harm than good. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(9):1304-9.

- 141. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. No evidence supports vitamin E indiscriminate supplementation. Biofactors. 2009;35(6):469-73.
- 142. Berton G, Castaldi MA, Cassatella MA, Nauseef WM. Editorial: Celebrating the 50th anniversary of the seminal discovery that the phagocyte respiratory burst enzyme is an NADPH oxidase. J Leukoc Biol. 2015;97(1):1-2.
- 143. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. Medicine (Baltimore). 2000;79(3):155-69.
- 144. van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. PLoS One. 2009;4(4):e5234.
- 145. Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR. Pancreatic betacells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. Diabetes. 2003;52(6):1457-63.
- 146. Rebelato E, Mares-Guia TR, Graciano MF, Labriola L, Britto LR, Garay-Malpartida HM, et al. Expression of NADPH oxidase in human pancreatic islets. Life Sci. 2012;91(7-8):244-9.
- 147. Buvelot H, Jaquet V, Krause KH. Mammalian NADPH Oxidases. Methods Mol Biol. 2019;1982:17-36.
- 148. 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.
- 149. Anvari E, Wikström P, Walum E, Welsh N. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. Free Radic Res. 2015;49(11):1308-18.
- 150. Bouzakri K, Veyrat-Durebex C, Holterman C, Arous C, Barbieux C, Bosco D, et al. Beta-Cell-Specific Expression of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 5 Aggravates High-Fat Diet-Induced Impairment of Islet Insulin Secretion in Mice. Antioxid Redox Signal. 2020;32(9):618-35.
- 151. Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. Free Radic Biol Med. 2009;47(9):1239-53.
- 152. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(4):677-83.
- 153. Karlsson A, Dahlgren C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. Antioxid Redox Signal. 2002;4(1):49-60.
- 154. Garcia RC, Segal AW. Changes in the subcellular distribution of the cytochrome b-245 on stimulation of human neutrophils. Biochem J. 1984;219(1):233-42.
- 155. Li JM, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. J Biol Chem. 2002;277(22):19952-60.
- 156. Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, Kanterewicz BI, Wu GY, Quinn MT, et al. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. Mol Cell Neurosci. 2005;29(1):97-106.
- 157. Block K, Gorin Y, Abboud HE. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(34):14385-90.
- 158. Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. Antioxid Redox Signal. 2005;7(3-4):308-17.
- 159. 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.
- 160. Wang X, Elksnis A, Wikström P, Walum E, Welsh N, Carlsson PO. The novel NADPH oxidase 4 selective inhibitor GLX7013114 counteracts human islet cell death in vitro. PLoS One. 2018;13(9):e0204271.
- 161. Fisher AB. Redox signaling across cell membranes. Antioxid Redox Signal. 2009;11(6):1349-56.
- 162. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007;87(1):245-313.

- 163. Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. J Biol Chem. 2003;278(22):20006-12.
- 164. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, et al. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. J Biol Chem. 2003;278(27):25234-46.
- 165. Taylor-Fishwick DA. NOX, NOX Who is There? The Contribution of NADPH Oxidase One to Beta Cell Dysfunction. Front Endocrinol (Lausanne). 2013;4:40.
- 166. Kowluru A. Friendly, and not so friendly, roles of Rac1 in islet β -cell function: lessons learnt from pharmacological and molecular biological approaches. Biochem Pharmacol. 2011;81(8):965-75.
- 167. Graciano MF, Santos LR, Curi R, Carpinelli AR. NAD(P)H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets. J Cell Physiol. 2011;226(4):1110-7.
- 168. Newsholme P, Keane D, Welters HJ, Morgan NG. Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. Clin Sci (Lond). 2007;112(1):27-42.
- 169. Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio MN, Patanè G, Rabuazzo AM, et al. Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. Metabolism. 2002;51(10):1340-7.
- 170. Sedeek M, Montezano AC, Hebert RL, Gray SP, Di Marco E, Jha JC, et al. Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes--potential targets for novel therapies. J Cardiovasc Transl Res. 2012;5(4):509-18.
- 171. Blanchetot C, Boonstra J. The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2008;18(1):35-45.
- 172. Santos CX, Nabeebaccus AA, Shah AM, Camargo LL, Filho SV, Lopes LR. Endoplasmic reticulum stress and Nox-mediated reactive oxygen species signaling in the peripheral vasculature: potential role in hypertension. Antioxid Redox Signal. 2014;20(1):121-34.
- 173. Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2009;18(2):122-7.
- 174. Hecker L, Cheng J, Thannickal VJ. Targeting NOX enzymes in pulmonary fibrosis. Cell Mol Life Sci. 2012;69(14):2365-71.
- 175. You YH, Okada S, Ly S, Jandeleit-Dahm K, Barit D, Namikoshi T, et al. Role of Nox2 in diabetic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;304(7):F840-8.
- 176. 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.
- 177. Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. Mediators Inflamm. 2008;2008:106507.
- 178. Michalska M, Wolf G, Walther R, Newsholme P. Effects of pharmacological inhibition of NADPH oxidase or iNOS on pro-inflammatory cytokine, palmitic acid or H2O2-induced mouse islet or clonal pancreatic β-cell dysfunction. Biosci Rep. 2010;30(6):445-53.
- Nunes Marsiglio-Librais G, Aparecida Vilas-Boas E, Carlein C, Hoffmann MDA, Roma LP, Carpinelli AR. Evidence for NADPH oxidase activation by GPR40 in pancreatic β -cells. Redox Rep. 2020;25(1):41-50.
- 180. Veluthakal R, Sidarala V, Kowluru A. NSC23766, a Known Inhibitor of Tiam1-Rac1 Signaling Module, Prevents the Onset of Type 1 Diabetes in the NOD Mouse Model. Cell Physiol Biochem. 2016;39(2):760-7.
- 181. Subasinghe W, Syed I, Kowluru A. Phagocyte-like NADPH oxidase promotes cytokine-induced mitochondrial dysfunction in pancreatic β-cells: evidence for regulation by Rac1. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011;300(1):R12-20.
- 182. Weaver JR, Holman TR, Imai Y, Jadhav A, Kenyon V, Maloney DJ, et al. Integration of proinflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction. Mol Cell Endocrinol. 2012;358(1):88-95.

- 183. Weaver JR, Grzesik W, Taylor-Fishwick DA. Inhibition of NADPH oxidase-1 preserves beta cell function. Diabetologia. 2015;58(1):113-21.
- 184. Yuan H, Zhang X, Huang X, Lu Y, Tang W, Man Y, et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of β-cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways. PLoS One. 2010;5(12):e15726.
- 185. Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, Gorąca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2012;60(4):277-94.
- 186. Cifuentes-Pagano E, Meijles DN, Pagano PJ. The quest for selective nox inhibitors and therapeutics: challenges, triumphs and pitfalls. Antioxid Redox Signal. 2014;20(17):2741-54.
- 187. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. Antioxid Redox Signal. 2015;23(5):406-27.
- 188. Fujikawa Y, Roma LP, Sobotta MC, Rose AJ, Diaz MB, Locatelli G, et al. Mouse redox histology using genetically encoded probes. Sci Signal. 2016;9(419):rs1.
- 189. Deglasse JP, Roma LP, Pastor-Flores D, Gilon P, Dick TP, Jonas JC. Glucose Acutely Reduces Cytosolic and Mitochondrial H. Antioxid Redox Signal. 2018.
- 190. Morgan B, Sobotta MC, Dick TP. Measuring E(GSH) and H2O2 with roGFP2-based redox probes. Free Radic Biol Med. 2011;51(11):1943-51.
- 191. Kono T, Tong X, Taleb S, Bone RN, Iida H, Lee CC, et al. Impaired Store-Operated Calcium Entry and STIM1 Loss Lead to Reduced Insulin Secretion and Increased Endoplasmic Reticulum Stress in the Diabetic β -Cell. Diabetes. 2018;67(11):2293-304.
- 192. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
- 193. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):676-82.
- 194. Teixeira CJ, Santos-Silva JC, de Souza DN, Rafacho A, Anhe GF, Bordin S. Dexamethasone during pregnancy impairs maternal pancreatic β -cell renewal during lactation. Endocr Connect. 2019;8(2):120-31.
- 195. Bankhead P, Fernández JA, McArt DG, Boyle DP, Li G, Loughrey MB, et al. Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. Lab Invest. 2018;98(1):15-26.
- 196. Xiang FL, Lu X, Strutt B, Hill DJ, Feng Q. NOX2 deficiency protects against streptozotocin-induced beta-cell destruction and development of diabetes in mice. Diabetes. 2010;59(10):2603-11.
- 197. Weaver J, Taylor-Fishwick DA. Relationship of NADPH Oxidase-1 expression to beta cell dysfunction induced by inflammatory cytokines. Biochem Biophys Res Commun. 2017;485(2):290-4.
- 198. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem. 1995;64:97-112.
- 199. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. Anticancer Agents Med Chem. 2011;11(4):341-6.
- 200. Wang Q, Zou MH. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) and Mitochondrial ROS in AMPK Knockout Mice Blood Vessels. Methods Mol Biol. 2018;1732:507-17.
- 201. Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. Antioxid Redox Signal. 2014;20(2):372-82.
- 202. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(41):15038-43.
- 203. Kauffman ME, Kauffman MK, Traore K, Zhu H, Trush MA, Jia Z, et al. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. React Oxyg Species (Apex). 2016;2(5):361-70.
- 204. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. J Cell Biol. 2018;217(6):1915-28.
- 205. Jitrapakdee S, Wutthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. Diabetologia. 2010;53(6):1019-32.

- 206. Santos LRB, Muller C, de Souza AH, Takahashi HK, Spégel P, Sweet IR, et al. NNT reverse mode of operation mediates glucose control of mitochondrial NADPH and glutathione redox state in mouse pancreatic β -cells. Mol Metab. 2017;6(6):535-47.
- 207. Miller CG, Holmgren A, Arnér ESJ, Schmidt EE. NADPH-dependent and -independent disulfide reductase systems. Free Radic Biol Med. 2018;127:248-61.
- 208. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000;1(1):31-9.
- 209. Oakley FD, Smith RL, Engelhardt JF. Lipid rafts and caveolin-1 coordinate interleukin-1beta (IL-1beta)-dependent activation of NFkappaB by controlling endocytosis of Nox2 and IL-1beta receptor 1 from the plasma membrane. J Biol Chem. 2009;284(48):33255-64.
- 210. Zhang AY, Yi F, Zhang G, Gulbins E, Li PL. Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells. Hypertension. 2006;47(1):74-80.
- 211. Han CY, Umemoto T, Omer M, Den Hartigh LJ, Chiba T, LeBoeuf R, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. J Biol Chem. 2012;287(13):10379-93.
- 212. Schröder K, Wandzioch K, Helmcke I, Brandes RP. Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(2):239-45.
- 213. Bacha F, Gungor N, Arslanian SA. Measures of beta-cell function during the oral glucose tolerance test, liquid mixed-meal test, and hyperglycemic clamp test. J Pediatr. 2008;152(5):618-21.
- 214. Choi CS, Kim MY, Han K, Lee MS. Assessment of β -cell function in human patients. Islets. 2012;4(2):79-83.
- 215. Kalwat MA, Cobb MH. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell. Pharmacol Ther. 2017;179:17-30.
- 216. Pedersen MG, Tagliavini A, Henquin JC. Calcium signaling and secretory granule pool dynamics underlie biphasic insulin secretion and its amplification by glucose: experiments and modeling. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019;316(3):E475-E86.
- 217. Ramadan JW, Steiner SR, O'Neill CM, Nunemaker CS. The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: implications for type 1 and type 2 diabetes. Cell Calcium. 2011;50(6):481-90.
- 218. Cardozo AK, Ortis F, Storling J, Feng YM, Rasschaert J, Tonnesen M, 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. 2005;54(2):452-61.
- 219. Sabourin J, Le Gal L, Saurwein L, Haefliger JA, Raddatz E, Allagnat F. Store-operated Ca2+ Entry Mediated by Orai1 and TRPC1 Participates to Insulin Secretion in Rat β -Cells. J Biol Chem. 2015;290(51):30530-9.
- 220. Gwiazda KS, Yang TL, Lin Y, Johnson JD. Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca2+homeostasis in beta-cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296(4):E690-701.
- 221. Brozzi F, Nardelli TR, Lopes M, Millard I, Barthson J, Igoillo-Esteve M, et al. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. Diabetologia. 2015;58(10):2307-16.
- 222. Meyerovich K, Ortis F, Allagnat F, Cardozo AK. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. J Mol Endocrinol. 2016;57(1):R1-R17.
- 223. Li J, Zhu H, Shen E, Wan L, Arnold JM, Peng T. Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. Diabetes. 2010;59(8):2033-42.
- 224. Kuwabara WM, Zhang L, Schuiki I, Curi R, Volchuk A, Alba-Loureiro TC. NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species induces endoplasmatic reticulum stress in neutrophillike HL60 cells. PLoS One. 2015;10(2):e0116410.
- 225. Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. J Cell Biol. 2010;191(6):1113-25.

- 226. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Mol Cell Biol. 2004;24(24):10703-17.
- 227. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. Antioxid Redox Signal. 2009;11(10):2409-27.
- 228. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 2005;280(49):40813-9.
- 229. Gianni D, Taulet N, Zhang H, DerMardirossian C, Kister J, Martinez L, et al. A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small-molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. ACS Chem Biol. 2010;5(10):981-93.
- 230. Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, German MS. The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. Mol Cell Biol. 2000;20(3):900-11.
- 231. Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. J Biol Chem. 2002;277(33):30010-8.
- 232. Kawamori D, Kajimoto Y, Kaneto H, Umayahara Y, Fujitani Y, Miyatsuka T, et al. Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. Diabetes. 2003;52(12):2896-904.
- 233. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. Curr Protoc Pharmacol. 2015;70:5.47.1-20.
- 234. Lukić ML, Stosić-Grujicić S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. Dev Immunol. 1998;6(1-2):119-28.
- 235. McEvoy RC, Madson KL. Pancreatic insulikn-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populatins during the perinatal development of the rat. I. Morphometric quantitation. Biol Neonate. 1980;38(5-6):248-54.
- 236. Kushner JA. The role of aging upon β cell turnover. J Clin Invest. 2013;123(3):990-5.
- 237. Ding L, Gysemans C, Mathieu C. β -Cell differentiation and regeneration in type 1 diabetes. Diabetes Obes Metab. 2013;15 Suppl 3:98-104.
- 238. Collombat P, Xu X, Heimberg H, Mansouri A. Pancreatic beta-cells: from generation to regeneration. Semin Cell Dev Biol. 2010;21(8):838-44.
- 239. Li RJ, Qiu SD, Tian H, Zhou SW. [Diabetes induced by multiple low doses of STZ can be spontaneously recovered in adult mice]. Dongwuxue Yanjiu. 2013;34(3):238-43.
- 240. Nir T, Melton DA, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. J Clin Invest. 2007;117(9):2553-61.
- 241. Bonner-Weir S, Guo L, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Lysy PA, Weir GC, et al. Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment. Rev Diabet Stud. 2012;9(4):407-16.
- 242. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. Nature. 2004;429(6987):41-6.
- 243. Liang J, Wu SY, Zhang D, Wang L, Leung KK, Leung PS. NADPH Oxidase-Dependent Reactive Oxygen Species Stimulate β-Cell Regeneration Through Differentiation of Endocrine Progenitors in Murine Pancreas. Antioxid Redox Signal. 2016;24(8):419-33.
- 244. Ahmed Alfar E, Kirova D, Konantz J, Birke S, Mansfeld J, Ninov N. Distinct Levels of Reactive Oxygen Species Coordinate Metabolic Activity with Beta-cell Mass Plasticity. Sci Rep. 2017;7(1):3994.
- 245. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. Nature. 1997;386(6623):399-402.

- 246. Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, et al. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. Genes Dev. 2003;17(20):2591-603.
- 247. Cheung CY, Tang CS, Xu A, Lee CH, Au KW, Xu L, et al. Exome-chip association analysis reveals an Asian-specific missense variant in PAX4 associated with type 2 diabetes in Chinese individuals. Diabetologia. 2017;60(1):107-15.
- 248. Mellado-Gil JM, Jiménez-Moreno CM, Martin-Montalvo A, Alvarez-Mercado AI, Fuente-Martin E, Cobo-Vuilleumier N, et al. PAX4 preserves endoplasmic reticulum integrity preventing beta cell degeneration in a mouse model of type 1 diabetes mellitus. Diabetologia. 2016;59(4):755-65.
- 249. Brun T, Franklin I, St-Onge L, Biason-Lauber A, Schoenle EJ, Wollheim CB, et al. The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes {beta}-cell proliferation and survival in rat and human islets. J Cell Biol. 2004;167(6):1123-35.
- 250. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. Cell. 2009;138(3):449-62.
- 251. Zhang Y, Fava GE, Wang H, Mauvais-Jarvis F, Fonseca VA, Wu H. PAX4 Gene Transfer Induces α -to- β Cell Phenotypic Conversion and Confers Therapeutic Benefits for Diabetes Treatment. Mol Ther. 2016;24(2):251-60.
- 252. Courtney M, Pfeifer A, Al-Hasani K, Gjernes E, Vieira A, Ben-Othman N, et al. In vivo conversion of adult α -cells into β -like cells: a new research avenue in the context of type 1 diabetes. Diabetes Obes Metab. 2011;13 Suppl 1:47-52.
- 253. Chung CH, Levine F. Adult pancreatic alpha-cells: a new source of cells for beta-cell regeneration. Rev Diabet Stud. 2010;7(2):124-31.
- 254. Heimberg H, Heremans Y, Jobin C, Leemans R, Cardozo AK, Darville M, et al. Inhibition of cytokine-induced NF-kB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kB super-repressor prevents b-cell apoptosis. Diabetes. 2001;50(10):2219-24.
- 255. Rebolledo OR, Raschia MA, Borelli MI, García ME, Gagliardino JJ. Islet NADPH oxidase activity is modulated unevenly by different secretagogues. Endocrine. 2010;38(2):309-11.
- 256. Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, et al. Palmitate induces reactive oxygen species production and β-cell dysfunction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase through Src signaling. J Diabetes Investig. 2014;5(1):19-26.
- 257. Ly LD, Xu S, Choi SK, Ha CM, Thoudam T, Cha SK, et al. Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. Exp Mol Med. 2017;49(2):e291.
- 258. El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. Endocrinology. 2003;144(9):4154-63.
- 259. Gehrmann W, Elsner M, Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β-cells. Diabetes Obes Metab. 2010;12 Suppl 2:149-58.
- 260. Maris M, Robert S, Waelkens E, Derua R, Hernangomez MH, D'Hertog W, et al. Role of the saturated nonesterified Fatty Acid palmitate in Beta cell dysfunction. J Proteome Res. 2013;12(1):347-62.
- 261. Gehrmann W, Würdemann W, Plötz T, Jörns A, Lenzen S, Elsner M. Antagonism Between Saturated and Unsaturated Fatty Acids in ROS Mediated Lipotoxicity in Rat Insulin-Producing Cells. Cell Physiol Biochem. 2015;36(3):852-65.
- 262. Oh YS, Bae GD, Baek DJ, Park EY, Jun HS. Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:384.
- 263. Lytrivi M, Castell AL, Poitout V, Cnop M. Recent Insights Into Mechanisms of β -Cell Lipoand Glucolipotoxicity in Type 2 Diabetes. J Mol Biol. 2020;432(5):1514-34.
- 264. Elsner M, Gehrmann W, Lenzen S. Peroxisome-generated hydrogen peroxide as important mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells. Diabetes. 2011;60(1):200-8.
- 265. Cunha DA, Cito M, Carlsson PO, Vanderwinden JM, Molkentin JD, Bugliani M, et al. Thrombospondin 1 protects pancreatic β-cells from lipotoxicity via the PERK-NRF2 pathway. Cell Death Differ. 2016;23(12):1995-2006.

- 266. Sargsyan E, Cen J, Roomp K, Schneider R, Bergsten P. Identification of early biological changes in palmitate-treated isolated human islets. BMC Genomics. 2018;19(1):629.
- 267. Ruttkay-Nedecky B, Nejdl L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, et al. The role of metallothionein in oxidative stress. Int J Mol Sci. 2013;14(3):6044-66.
- 268. Jonas JC, Bensellam M, Duprez J, Elouil H, Guiot Y, Pascal SM. Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab. 2009;11 Suppl 4:65-81.
- 269. Pak VV, Ezeriņa D, Lyublinskaya OG, Pedre B, Tyurin-Kuzmin PA, Mishina NM, et al. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. Cell Metab. 2020;31(3):642-53.e6.
- 270. Morgan B, Van Laer K, Owusu TN, Ezeriņa D, Pastor-Flores D, Amponsah PS, et al. Real-time monitoring of basal H2O2 levels with peroxiredoxin-based probes. Nat Chem Biol. 2016;12(6):437-43.
- 271. Li F, Munsey TS, Sivaprasadarao A. TRPM2-mediated rise in mitochondrial Zn. Cell Death Differ. 2017;24(12):1999-2012.
- 272. Xu S, Nam SM, Kim JH, Das R, Choi SK, Nguyen TT, et al. Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress. Cell Death Dis. 2015;6:e1976.
- 273. Ly LD, Ly DD, Nguyen NT, Kim JH, Yoo H, Chung J, et al. Mitochondrial Ca. Mol Cells. 2020;43(1):66-75.
- 274. Contreras-Ferrat A, Llanos P, Vásquez C, Espinosa A, Osorio-Fuentealba C, Arias-Calderon M, et al. Insulin elicits a ROS-activated and an IP₃-dependent Ca²⁺ release, which both impinge on GLUT4 translocation. J Cell Sci. 2014;127(Pt 9):1911-23.
- 275. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. Redox Biol. 2015;6:260-71.
- 276. Li B, Tian J, Sun Y, Xu TR, Chi RF, Zhang XL, et al. Activation of NADPH oxidase mediates increased endoplasmic reticulum stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rabbits. Biochim Biophys Acta. 2015;1852(5):805-15.
- 277. Entingh AJ, Law BK, Moses HL. Induction of the C/EBP homologous protein (CHOP) by amino acid deprivation requires insulin-like growth factor I, phosphatidylinositol 3-kinase, and mammalian target of rapamycin signaling. Endocrinology. 2001;142(1):221-8.
- 278. Jousse C, Bruhat A, Harding HP, Ferrara M, Ron D, Fafournoux P. Amino acid limitation regulates CHOP expression through a specific pathway independent of the unfolded protein response. FEBS Lett. 1999;448(2-3):211-6.

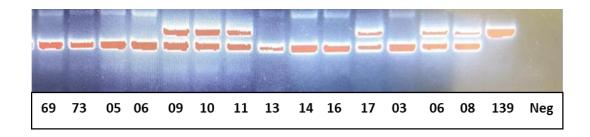
APÊNDICE A – Genotipagem de camundongos NOX2 KO:roGFP2-Orp1

Nos experimentos de histologia redox, realizamos o cruzamento de camundongos NOX2 KO com camundongos roGFP2-Orp1, a fim de obter camundongos NOX2 KO:roGFP2-Orp1. A herança NOX2 é ligada ao cromossomo X e as fêmeas e machos NOX2 KO adquiridos da Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA) são homozigotas e hemizigotos, respectivamente. Portanto, após o cruzamento de NOX2 KO fêmeas com roGFP2-Orp1 machos, obtivemos machos hemizigotos para NOX2 KO e fêmeas heterozigotas para NOX2 KO, sendo ambos heterozigotos para roGFP2-Orp1. Para garantir o *knockout* para NOX2, realizamos a genotipagem dos animais WT, NOX2 KO e NOX2 KO:roGFP2-Orp1 e, dessa forma, comprovamos o genótipo adequado dos camundongos utilizados, de acordo com a tabela 1A e a figura 1A. Portanto, para os experimentos de histologia redox, selecionamos a prole composta apenas por machos, assim como os animais 05, 06, 13, 14, 16 e 03, apresentados na tabela 1A como mutantes.

Tabela 1A – Animais utilizados na genotipagem.

Grupo	Animal ID	Genótipo	Gênero
NOX2 KO (Jackson Lab)	69	Hemizigoto	Macho
	73	Homozigoto	Fêmea
NOX2 KO:roGFP2-Orp1	05	Mutante	Macho
	06	Mutante	Macho
	09	Heterozigoto	Fêmea
	10	Heterozigoto	Fêmea
	11	Heterozigoto	Fêmea
	13	Mutante	Macho
	14	Mutante	Macho
	16	Mutante	Macho
	17	Heterozigoto	Fêmea
	03	Mutante	Macho
	06	Heterozigoto	Fêmea
	08	Heterozigoto	Fêmea
Wild Type	139	Wild type	Fêmea

Figura 1A – Genotipagem de camundongos WT, NOX2 KO e NOX2 KO:roGFP2-Orp1.



Bandas obtidas por separação em gel de agarose dos camundongos descritos na tabela 1A. Bandas esperadas: macho NOX2 KO hemizigoto e fêmea NOX2 KO homozigota (195 bp) / WT (240 bp) / fêmea NOX2 KO heterozigota (195 bp and 240 bp). Bp: pares de bases. Neg – controle negativo.

APÊNDICE B – Artigos publicados no período

Chronic activation of GPR40 does not negatively impact upon BRIN-BD11 pancreatic β-cell physiology and function.

Vilas-Boas EA, Karabacz N, Marsiglio-Librais GN, Valle MMR, Nalbach L, Ampofo E, Morgan B, Carpinelli AR, Roma LP. Pharmacol Rep. 2020. Apr 9.

DOI: 10.1007/s43440-020-00101-6.

❖ Intermittent fasting for twelve weeks leads to increase in fat mass and hyperinsulinemia in young female Wistar rats.

Munhoz AC, **Vilas-Boas EA**, Panveloski-Costa AC, Leite JSM, Lucena CF, Riva P, Oliveira HE, Carpinelli AR. Nutrients. 2020 Apr 9;12(4):1029.

DOI: 10.3390/nu12041029.

 \diamond Evidence for NADPH oxidase activation by GPR40 in pancreatic β-cells.

Marsiglio-Librais GN, **Vilas-Boas EA**, Carlein C, Hoffmann MDA, Roma LP, Carpinelli AR. Redox Rep. 2020 Dec;25(1):41-50.

DOI: 10.1080/13510002.2020.1757877.

❖ Transient NADPH oxidase 2-dependent H₂O₂ production drives early palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic islets.

Vilas-Boas EA, Nalbach L, Ampofo E, Lucena CF, Naudet L, Ortis F, Carpinelli AR, Morgan B, Roma LP. Free Radical Biology & Medicine. 2020. Nov 27;162:1-13.

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.023.

Pharmacological Reports https://doi.org/10.1007/s43440-020-00101-6

ARTICLE



Chronic activation of GPR40 does not negatively impact upon BRIN-BD11 pancreatic β -cell physiology and function

Eloisa Aparecida Vilas-Boas^{1,2} · Noémie Karabacz² · Gabriela Nunes Marsiglio-Librais¹ · Maíra Melo Rezende Valle¹ · Lisa Nalbach³ · Emmanuel Ampofo³ · Bruce Morgan⁴ · Angelo Rafael Carpinelli¹ · Leticia Prates Roma²

Received: 4 February 2020 / Revised: 18 March 2020 / Accepted: 21 March 2020 © The Author(s) 2020

Abstract

Background Free fatty acids (FFAs) are known for their dual effects on insulin secretion and pancreatic β -cell survival. Short-term exposure to FFAs, such as palmitate, increases insulin secretion. On the contrary, long-term exposure to saturated FFAs results in decreased insulin secretion, as well as triggering oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress, culminating in cell death. The effects of FFAs can be mediated either via their intracellular oxidation and consequent effects on cellular metabolism or via activation of the membrane receptor GPR40. Both pathways are likely to be activated upon both short- and long-term exposure to FFAs. However, the precise role of GPR40 in β -cell physiology, especially upon chronic exposure to FFAs, remains unclear.

Methods We used the GPR40 agonist (GW9508) and antagonist (GW1100) to investigate the impact of chronically modulating GPR40 activity on BRIN-BD11 pancreatic β -cells physiology and function.

Results We observed that chronic activation of GPR40 did not lead to increased apoptosis, and both proliferation and glucose-induced calcium entry were unchanged compared to control conditions. We also observed no increase in H_2O_2 or superoxide levels and no increase in the ER stress markers p-eIF2 α , CHOP and BIP. As expected, palmitate led to increased H_2O_2 levels, decreased cell viability and proliferation, as well as decreased metabolism and calcium entry. These changes were not counteracted by the co-treatment of palmitate-exposed cells with the GPR40 antagonist GW1100.

Conclusions Chronic activation of GPR40 using GW9508 does not negatively impact upon BRIN-BD11 pancreatic β-cells physiology and function. The GPR40 antagonist GW1100 does not protect against the deleterious effects of chronic palmitate exposure. We conclude that GPR40 is probably not involved in mediating the toxicity associated with chronic palmitate exposure.

Keywords Lipotoxicity · GPR40 activation · β -cells · Palmitate

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s43440-020-00101-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

 □ Leticia Prates Roma leticia.prates-roma@uks.eu

Published online: 09 April 2020

- Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, SP, Brazil
- Department of Biophysics, Center for Human and Molecular Biology, Saarland University, Universität Des Saarlandes, CIPMM, Geb. 48, 66421 Homburg/Saar, Germany
- Institute for Clinical and Experimental Surgery, Saarland University, 66421 Homburg/Saar, Germany
- Institute of Biochemistry, Center for Human and Molecular Biology (ZHMB), Saarland University, 66123 Saarbrücken, Germany

Introduction

Free fatty acids (FFAs) play a central role in cellular physiology as they are both components of biological membranes and an important cellular energy source. In pancreatic β -cells, FFAs can acutely enhance glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) either by modulation of intracellular metabolism or via activation of specific G protein-coupled receptors (GPCRs) [1–4]. In contrast, chronic exposure of pancreatic β -cells to saturated FFAs leads to impaired insulin secretion, β -cell dysfunction and apoptosis, a condition that has been termed lipotoxicity [5–12].

Lipotoxicity is a complex condition and several different molecular mechanisms have been suggested to underlie chronic FFA toxicity in β -cells. These mechanisms include,





Article

Intermittent Fasting for Twelve Weeks Leads to Increases in Fat Mass and Hyperinsulinemia in Young Female Wistar Rats

Ana Cláudia Munhoz ^{1,*}, Eloisa Aparecida Vilas-Boas ¹, Ana Carolina Panveloski-Costa ¹, Jaqueline Santos Moreira Leite ¹, Camila Ferraz Lucena ¹, Patrícia Riva ¹, Henriette Emilio ² and Angelo R. Carpinelli ¹

- Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, 1524 Professor Lineu Prestes avenue, Butanta, São Paulo 05508-900, Brazil; elovilasboas@usp.br (E.A.V.-B.); anakpan@gmail.com (A.C.P.-C.); jaqueline.leite@usp.br (J.S.M.L.); cflucena07@gmail.com (C.F.L.); patricia.riva@gmail.com (P.R.); angelo@icb.usp.br (A.R.C.)
- Department of General Biology, Ponta Grossa State University, 4748 General Carlos Cavalcanti avenue, Uvaranas, Parana, PR 84030-900, Brazil: henry.emilio@gmail.com
- * Correspondence: anamunoz@icb.usp.br; Tel.: +55-11-98-755-9099

Received: 29 February 2020; Accepted: 6 April 2020; Published: 9 April 2020



Abstract: Fasting is known to cause physiological changes in the endocrine pancreas, including decreased insulin secretion and increased reactive oxygen species (ROS) production. However, there is no consensus about the long-term effects of intermittent fasting (IF), which can involve up to 24 hours of fasting interspersed with normal feeding days. In the present study, we analyzed the effects of alternate-day IF for 12 weeks in a developing and healthy organism. Female 30-day-old Wistar rats were randomly divided into two groups: control, with free access to standard rodent chow; and IF, subjected to 24-hour fasts intercalated with 24-hours of free access to the same chow. Alternate-day IF decreased weight gain and food intake. Surprisingly, IF also elevated plasma insulin concentrations, both at baseline and after glucose administration collected during oGTT. After 12 weeks of dietary intervention, pancreatic islets displayed increased ROS production and apoptosis. Despite their lower body weight, IF animals had increased fat reserves and decreased muscle mass. Taken together, these findings suggest that alternate-day IF promote β -cell dysfunction, especially in developing animals. More long-term research is necessary to define the best IF protocol to reduce side effects.

Keywords: intermittent fasting; fat mass; insulin secretion; pancreatic islet

1. Introduction

The increasing prevalence of obesity around the globe is known to be linked to unhealthy eating patterns and a sedentary lifestyle. Treatments in obesity involve hypocaloric diets associated with physical exercises, producing an overall energy deficit [1,2] and leading to weight loss. One of the many diets that results in weight loss in both humans and laboratory animal models is intermittent fasting (IF). The most common IF protocols adopted by people in attempt to lose weight involve daily fasting for up to 16 hours; or fasting periods of up to 24 hours interspersed with normal feeding days [3,4]. Despite demonstrated weight loss [5–7], more studies are needed to evaluate whether alternate-day IF diets promote health benefits or could cause undesired effects in the long run.

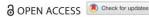
Several studies about IF in both volunteers and animal models have uncovered beneficial effects, such as improved insulin sensitivity and glucose homeostasis [8–10]; improved performance and metabolic efficiency during exercise [11], increased alertness [12], and increased life expectancy [13–15];

Nutrients 2020, 12, 1029; doi:10.3390/nu12041029

www.mdpi.com/journal/nutrients

REDOX REPORT 2020, VOL. 25, NO. 1, 41–50 https://doi.org/10.1080/13510002.2020.1757877







Evidence for NADPH oxidase activation by GPR40 in pancreatic β-cells

Gabriela Nunes Marsiglio-Librais 🗓 a, Eloisa Aparecida Vilas-Boas 🧓 a,b, Christopher Carlein b, Markus Daniel Alexander Hoffmann^b, Leticia Prates Roma ^{b*} and Angelo Rafael Carpinelli^a

^aDepartment of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil; ^bDepartment of Biophysics, Center for Human and Molecular Biology, CIPMM, Saarland University, Homburg/Saar, Germany

ABSTRACT

Objective: Investigate the involvement of the fatty acids receptor GPR40 in the assembly and activation of NADPH oxidase and the implications on pancreatic β-cell function.

Methods: BRIN-BD11 β-cells were exposed to GPR40 agonist (GW9508) or linoleic acid in different glucose concentrations. Superoxide and H_2O_2 were analyzed, respectively, by DHE fluorescence and by fluorescence of the H_2O_2 sensor, roGFP2-Orp1. Protein contents of p47^{phox} in plasma membrane and cytosol were analyzed by western blot. NADPH oxidase role was evaluated by p22^{phox} siRNA or by pharmacological inhibition with VAS2870. NOX2 KO islets were used to measure total cytosolic calcium and insulin secretion.

Results: GW9508 and linoleic acid increased superoxide and H2O2 contents at 5.6 and 8.3 mM of glucose. In addition, in 5.6 mM, but not at 16.7 mM of glucose, activation of GPR40 led to the translocation of p47 $^{\rm phox}$ to the plasma membrane. Knockdown of p22 $^{\rm phox}$ abolished the increase in superoxide after GW9508 and linoleic acid. No differences in insulin secretion were found between wild type and NOX2 KO islets treated with GW9508 or linoleic acid.

Discussion: We report for the first time that acute activation of GPR40 leads to NADPH oxidase activation in pancreatic β -cells, without impact on insulin secretion.

KEYWORDS

GPR40; NADPH oxidase; ROS; x translocation: BRIN-BD11; GW9508; Linoleic acid; NOX2 KO islets; roGFP2-Orp1; Insulin secretion

Introduction

Although glucose is the main secretagogue of insulin, other molecules including hormones, amino acids and free fatty acids (FFAs) also modulate insulin secretion [1-4]. G proteincoupled receptors activated by FFAs, namely GPRs, were identified in different cell types [5]. Among them, GPR40 is highly expressed in pancreatic β-cells and has a great affinity for saturated and unsaturated long-chain FFAs. The activation of GPR40 triggers signaling cascades involved in the process of insulin secretion [6-8]. The complete picture following GPR40 activation is still unknown, but it involves activation of phospholipase C (PLC), via Gaq protein, leading to the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) in diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃), which respectively activates protein kinase C (PKC) and mobilizes calcium from endoplasmic reticulum [7,9,10].

Importantly, it was shown that GPR40 inhibition impairs FFA-stimulated insulin secretion in vitro [1]. In addition, pancreatic islets of human donors with type 2 diabetes mellitus have diminished expression of GPR40 [11] and obese individuals have a higher frequency of GPR40 mutations, leading to impairment of insulin secretion [12].

Due to these findings, GPR40 was proposed as a valuable target for the development of new drugs for the treatment of type 2 diabetes. Thus, in the past years, several agonist molecules have been developed and used in in vitro, mouse models [13-18] and clinical trials [18-22] aiming to understand the impact of activating GPR40 for whole-body glycemic control.

Reactive oxygen species (ROS) have been suggested as signaling molecules important for insulin secretion, reviewed in [23]. Two important sources of ROS in pancreatic β-cells are the electron transport chain and the NADPH oxidases. NADPH oxidase produces superoxide and was originally described in phagocytic cells in which it is of great importance to eliminate bacteria and other pathogens [24,25]. The complex is composed by two membrane subunits, gp91 phox and p22^{phox}, forming the flavocytochrome b558, catalytic core of the enzyme, the cytosolic subunits p67^{phox}, p47^{pho} and p40^{phox}, and the small GTPase Rac [24,26].

For activation of the complex, the organizer subunit p47^{phox} is phosphorylated by PKC, promoting the translocation of all cytosolic subunits to the membrane and their association with the membrane subunits. The assembled complex produces superoxide anions through the reduction of oxygen molecule, utilizing NADPH as an electron donor [24,26].

Despite its importance in phagocytes, NADPH oxidase is ubiquitously expressed [25]. Our group has previously demonstrated the expression of NADPH oxidase subunits in human and rodent pancreatic islets and insulin-secreting β -cell lines [27,28]. The superoxide produced may be involved in the process of insulin secretion, since the acute inhibition of NADPH oxidase by DPI or p47^{phox} oligonucleotide antisense promote the reduction of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) [29]. NADPH oxidase also participates in the palmitateinduced superoxide production and insulin secretion [30]. The mechanism, however, is still unclear.

CONTACT Gabriela Nunes Marsiglio-Librais agabinunes21@yahoo.com.br 🗗 Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes 1524, São Paulo, SP, Brazil *Equal contribution

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Free Radical Biology and Medicine 162 (2021) 1-13



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed



Original article

Transient NADPH oxidase 2-dependent H₂O₂ production drives early palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic islets

Eloisa Aparecida Vilas-Boas ^{a,b}, Lisa Nalbach ^c, Emmanuel Ampofo ^c, Camila Ferraz Lucena ^b, Léa Naudet ^a, Fernanda Ortis ^d, Angelo Rafael Carpinelli ^b, Bruce Morgan ^e, Leticia Prates Roma

- ^a Department of Biophysics, Center for Human and Molecular Biology (ZHMB), Saarland University, Homburg, Germany
- Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil Institute for Clinical and Experimental Surgery, Saarland University, Homburg, Germany
- d Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil e Institute for Biochemistry, Center for Human and Molecular Biology (ZHMB), Saarland University, Saarbrücken, Germany

ARTICLE INFO

Keywords: β-Cell NADPH oxidase ER stress Lipotoxicity

ABSTRACT

Modern lifestyles, including lack of physical activity and poor nutritional habits, are driving the rapidly increasing prevalence of obesity and type 2 diabetes. Increased levels of free fatty acids (FFAs), particularly saturated FFAs, in obese individuals have been linked to pancreatic β-cell failure. This process, termed lipotoxicity, involves activation of several stress responses, including ER stress and oxidative stress. However, the molecular underpinnings and causal relationships between the disparate stress responses remain unclear. Here we employed transgenic mice, expressing a genetically-encoded cytosolic H₂O₂ sensor, roGFP2-Orp1, to monitor dynamic changes in H₂O₂ levels in pancreatic islets in response to chronic palmitate exposure. We identified a transient increase in H2O2 levels from 4 to 8 h after palmitate addition, which was mirrored by a concomitant decrease in cellular NAD(P)H levels. Intriguingly, islets isolated from NOX2 knock-out mice displayed no H₂O₂ transient upon chronic palmitate treatment. Furthermore, NOX2 knockout rescued palmitate-dependent impairment of insulin secretion, calcium homeostasis and viability. Chemical inhibition of NOX activity protected islets from palmitate-induced impairment in insulin secretion, however had no detectable impact upon the induction of ER stress. In summary, our results reveal that transient NOX2-dependent H₂O₂ production is a likely cause of early palmitate-dependent lipotoxic effects.

1. Introduction

The alarming worldwide increase in obesity and metabolic syndrome is mainly related to modern lifestyles, particularly decreased physical activity and diets increasingly rich in simple carbohydrates and saturated fats [1-4]. Palmitate is the most common saturated fatty acid in humans, accounting for 20-30% of total fatty acids [5,6]. Increased palmitate levels in obesity have been linked to multiple conditions, including hypothalamic insulin resistance, inflammation and memory loss [7,8]. Furthermore, palmitate-induced lipotoxicity has also been correlated with pancreatic β -cell failure and the onset of type 2 diabetes

The molecular underpinnings of lipotoxicity have been extensively explored, especially in pancreatic β -cells. Lipotoxicity involves activation of inflammatory pathways, triggering of the unfolded protein response (UPR), and induction of oxidative stress, ultimately leading to β -cell dysfunction and apoptosis [10,12,13]. However, the causal and hierarchical relationships between these various stress responses, as well as the question of whether there is a common activation mechanism, remain unclear.

Although certain reactive oxygen species (ROS) are now known to have important physiological roles, the overproduction of ROS correlates with the development of many pathologies, including insulin resistance and diabetes [14,15]. Indeed, chronic exposure to palmitate has been shown to increase ROS levels in insulin-producing $\beta\text{-cells}$ and cultured rodent islets [16-23]. Furthermore, pancreatic β -cells are known to express relatively low levels of classic antioxidant enzymes, including catalase and glutathione peroxidases (GPXs) and thus have

E-mail address: leticia.prates-roma@uks.eu (L.P. Roma).

https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.023

Received 22 July 2020; Received in revised form 18 November 2020; Accepted 20 November 2020 Available online 27 November 2020 0891-5849/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved

^{*} Corresponding author.

APÊNDICE C – Artigos aceitos / em revisão

Melatonin regulates maternal pancreatic remodeling and B-cell function during pregnancy and lactation.

Gomes PRL, **Vilas-Boas EA**, Leite EA, Munhoz AC, Lucena CF, Amaral FG, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J.

Artigo aceito para publicação em: Journal of Pineal Research.

Villaca CBP, Paula CC, Oliveira CC, Vilas-Boas EA, Santos-Silva JC, Oliveira SF, Abdulkader F, Ferreira SM, Ortis F.

Artigo em revisão em: Experimental Physiology.

APÊNDICE D – Manuscritos em preparação

❖ NADPH oxidase 2-derived ROS are not involved in pancreatic islet re-vascularization and transplantation outcome.

Nalbach L, Glas J, Hoffmann M, Vilas-Boas EA, Ribot N, Araujo L, Carlein C, Ampofo E, Roma LP.

 Early NOX2 modulation as a potential target against pancreatic β-cell dysfunction during type 1 diabetes.

Vilas-Boas EA, Nalbach L, Almeida DC, Ampofo E, Carpinelli AR, Roma LP, Ortis F.

- * HNF4α expression is important for cytokine-induced β-cell death.
 - Di Stefano AG, Ramos FC, Ferreira SM, Cruz CO, **Vilas-Boas EA**, Villaca CBP, Almeida DC, Boschero AC, Santos GJ, Ortis F.
- Pancreatic β-cells express Dual oxidases 1 and 2.
 Almeida DC, Vilas-Boas EA, Silveira GM, Ferreira SM, Carpinelli AR, Ortis F.
- ❖ Metformin alone exerts anti-proliferative, pro-apoptotic and oxidative effects in rat pancreatic beta cells in vitro.

Valle MMR, Vilas-Boas EA, Lucena CF, Teixera SM, Muscara MN, Carpinelli AR.

APÊNDICE E – Apresentação de trabalho em congressos.

- ❖ Vilas-Boas EA, Roma LP, Ortis F, Carpinelli AR. Pro-inflammatory cytokines and beta cells death: role of cytosolic ROS. 55th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Barcelona, Espanha) 2019.
- ❖ Vilas-Boas EA, Almeida DC, Oliveira CC, Villaca CBP, Ortis F, Carpinelli AR. NADPH oxidase and beta cell impairment during inflammation. Post-EASD Workshop 2018 – EASD Islet Study Group (Potsdam, Alemanha) - 2018.
- ❖ Vilas-Boas EA, Ortis F, Carpinelli AR. Envolvimento de NOX-1 na viabilidade de células secretoras de insulina. 13º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo (São Pedro, São Paulo, Brasil) 2018.
- ❖ Vilas-Boas EA, Ortis F, Carpinelli AR. Envolvimento de NOX-1 na apoptose de células secretoras de insulina expostas a citocinas pró-inflamatórias. II Encontro Científico do Departamento de Fisiologia e Biofísica (São Paulo, Brasil) 2017. Prêmio de menção honrosa.
- ❖ Vilas-Boas EA, Ortis F, Carpinelli AR. Envolvimento de isoformas da NADPH oxidase na disfunção de células secretoras de insulina expostas a citocinas próinflamatórias. I Encontro Científico do Departamento de Fisiologia e Biofísica (São Paulo, Brasil) 2016.