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

AGRADECIMENTOS

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).

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 (H_2O_2) 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 H_2O_2 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 H_2O_2 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 (H_2O_2) 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.

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 µm (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 pós-

prandial. 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).



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).





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 Ca²⁺ sensíveis à voltagem. Tais efeitos culminam com o influxo intracelular de Ca²⁺, 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 A (PKA). Fonte: Newsholme P et al., 2010 (28).

Tome: Newsholme T et al., 2010 (20).

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 (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-1 β , 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 (NFkB) 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 Ca^{2+} 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 NFκB), 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.





A ligação das citocinas inflamatórias aos seus receptores específicos localizados na membrana da célula beta desencadeia a ativação dos fatores de transcrição NF κ B 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.

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

1.4.3 Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2): glicolipotoxicidade

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

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 (eIf 2α), 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 elf 2α , o qual é um fator-chave na iniciação da tradução de proteínas. A fosforilação de elf 2α 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 eIf2a, 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/eIF2α. 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 ($O_2^{\bullet-}$) 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 H_2O_2 por ação enzimática. O RE também é uma fonte de produção de H_2O_2 durante o dobramento oxidativo de proteínas. Durante a formação de pontes dissulfeto, o O_2 é aceptor final de elétrons, levando à formação de H_2O_2 e, como as células beta produzem grandes quantidades de insulina e cada molécula necessita da formação de três pontes dissulfeto, há elevada produção de H_2O_2 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).



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 H₂O₂, 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 H₂O₂ 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 H_2O_2 , como catalase e glutationa peroxidase (128-130). Ao mesmo tempo em que este fato pode ser conveniente por possibilitar a utilização do H_2O_2 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 H_2O_2 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 descobriuse 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}, NOXO1 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 NOXO1 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.

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 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-1 β 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-1 β 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.

6 CONCLUSÕES

Utilizamos pela primeira vez um sensor redox específico para avaliar o efeito temporal na produção de H_2O_2 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 H_2O_2 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 H_2O_2 citosólico/nuclear e um aumento contínuo de H_2O_2 mitocondrial. O aumento de H_2O_2 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 H_2O_2 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.

Célula β pancreática

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 NF κ B. 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. 4^a 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: <u>http://www.icmje.org</u>

24. Hope SV, Knight BA, Shields BM, Hattersley AT, McDonald TJ, Jones AG. Random nonfasting 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 betacell 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 glucoseinduced 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 beta-cells). 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.

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.
 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: <u>www.diabetes.org.br</u>.

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.

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.
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 immunemediated 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 IRE1 α /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.

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 phagocytelike 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.

179. 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 cytokineinduced 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 streptozotocininduced 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 oxidasederived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. J Biol Chem. 2012;287(13):10379-93. 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.
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.
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.

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.
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 oxidasedependent 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 streptozotocininduced 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 selfduplication 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.

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.
Pak VV, Ezerina D, Lyublinskava OG, Pedre B, Tyurin-Kuzmin PA, Mishina NM, et al.

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. Realtime 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.