

Arnaldo Henrique de Souza

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

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Professor Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Versão Original

São Paulo
2016

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

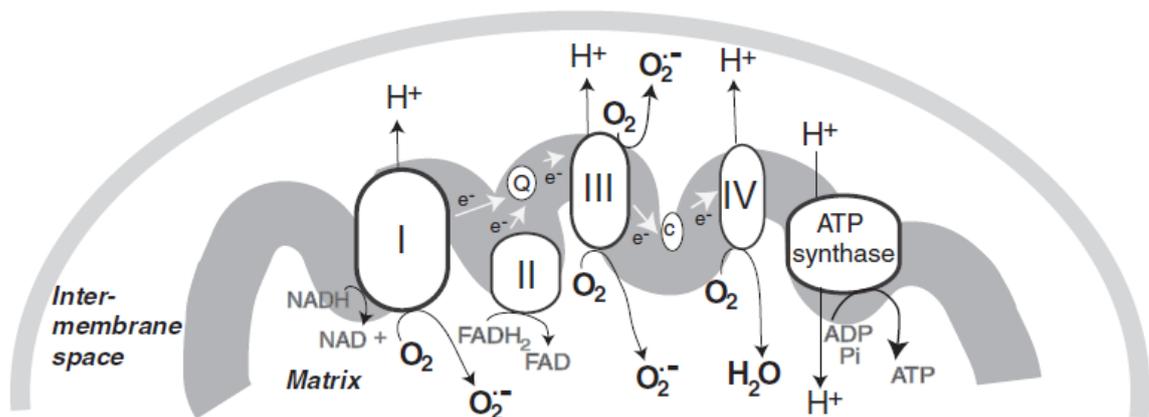


Figura 1 – Funcionamento da cadeia transportadora de elétron mitocondrial. Fonte de Handy e Loscalzo (2012).

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

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

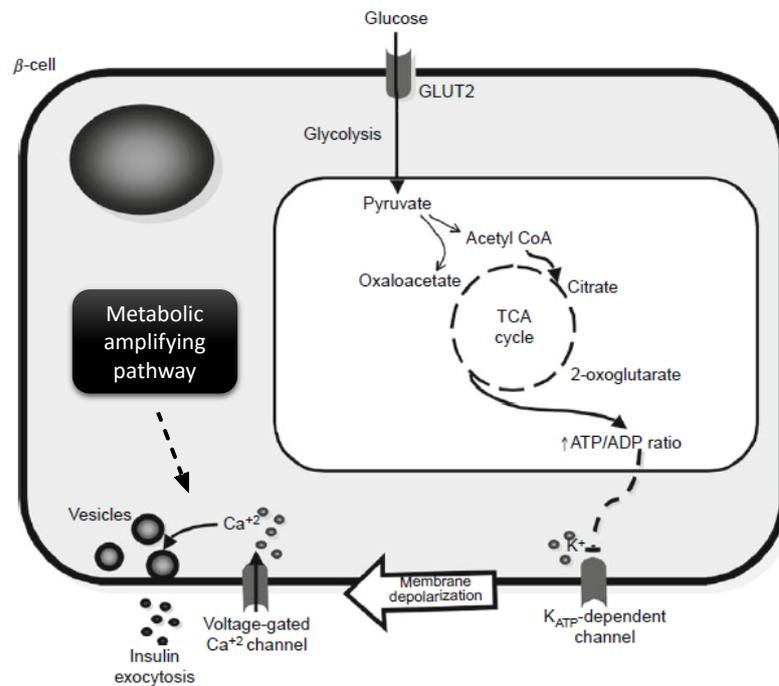


Figura 2 – Mecanismo de secreção de insulina estimulada pela glicose. Imagem adaptada de Torres et al (2009).

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

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

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

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

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

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

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

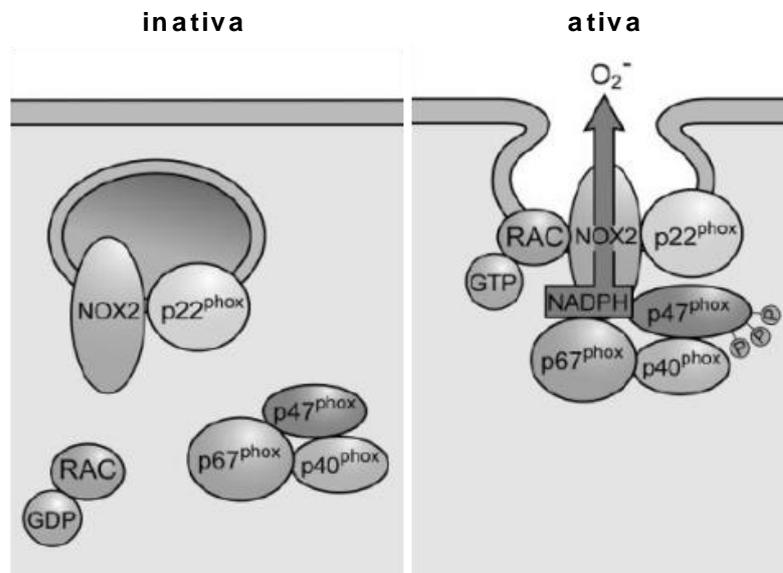


Figura 3 – Ativação da NOX2 em fagócitos. Adaptado de Karen Bedard e Karl-Heinz Krause (2007).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

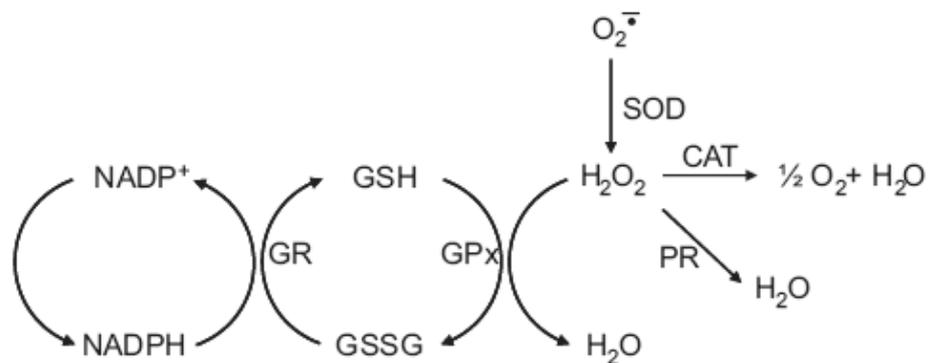


Figura 4 – Esquema da degradação enzimática de ERO. Adaptado de Kalyanaraman (2013).

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

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

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

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

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

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

Em um estudo, observou-se que a glicose, agudamente, induz a oxidação do composto químico DCFH (*Dichlorodihydrofluorescein*), refletindo o possível aumento de peróxido de hidrogênio (54). Em outro, foi observado o mesmo efeito agudo da glicose, mas na produção do radical $O_2^{\cdot-}$, obtido pela oxidação da sonda DHE ou HE (dihidroetídeo ou *dihydroethidium*) (60). Em ambos, os autores concluíram que o aumento de ERO é um mecanismo de sinalização para a exocitose, contribuindo para a hipótese da ativação da NOX como parte do processo de secreção de insulina em ilhotas de ratos (40). Contudo, os efeitos da glicose sobre a geração de ERO ou na modulação do estado redox são bastante controversos. Outros estudos mostram que o aumento na geração/conteúdo de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$, ocorre em baixas concentrações, ou na ausência do nutriente (55, 59, 61, 62). Parte dessas controvérsias (modulação redox pela glicose e a função da enzima NOX em células β) pode estar relacionada aos métodos utilizados para medir a geração, a localização dessas espécies reativas ou, como já vimos, dos meios de inibição da NOX.

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

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

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

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

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

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

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

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

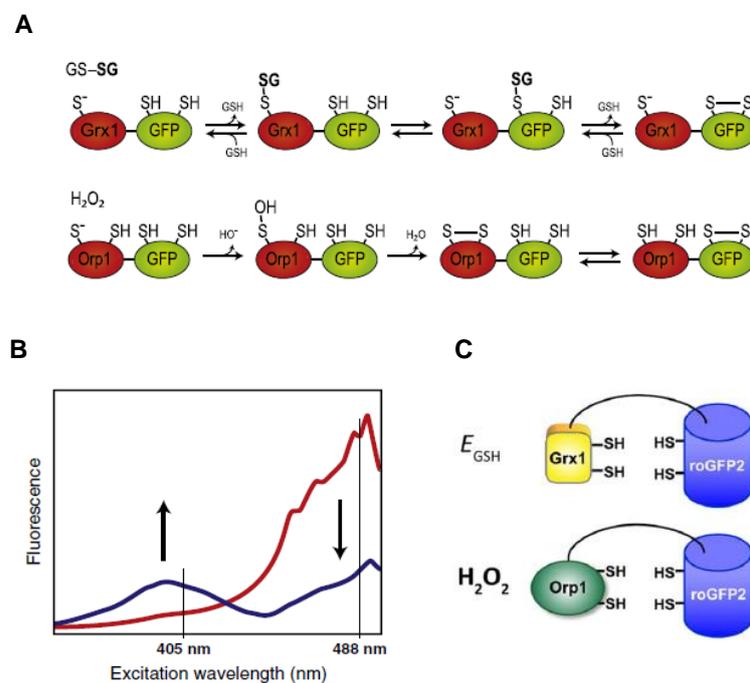


Figura 5 – Biossensores roGFP2 para E_{GSH} e H₂O₂. Fonte Dick e Morgan (2015).

Vejamos um exemplo de comparação entre sondas redox criadas a partir dois tipos de proteínas citados acima. Um estudo conduzido em células β pancreáticas de ratos concluiu que pode haver confusão na interpretação dos dados obtidos com a sonda mito-Hyper, sensível a H₂O₂ e desenvolvida a partir de rxYFP, por causa do pH intracelular (61). Mudanças no pH mitocondrial, induzidas pela glicose, apresentaram efeito oxidante sobre a oxidação do biossensor – o que foi completamente oposto ao observado com a sonda mito-roGFP1 (redução na oxidação do sensor). Esta última, por sua vez, não apresentou mudanças significativas na fluorescência em resposta a variações fisiológicas do pH (61). Nesse sentido, foi sugerido que: para melhor compreensão dos dados obtidos com a sonda Hyper, sejam

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS¹

1. Jolles S, Paul Langerhans. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):243.
2. Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes*. 1994;43(5):703-11.
3. Schuit FC. Is GLUT2 required for glucose sensing? *Diabetologia*. 1997;40(1):104-11.
4. Spéjel P, Sharoyko VV, Goehring I, Danielsson AP, Malmgren S, Nagorny CL, et al. Time-resolved metabolomics analysis of β -cells implicates the pentose phosphate pathway in the control of insulin release. *Biochem J*. 2013;450(3):595-605.
5. Rebelato E, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR. Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism. *PLoS One*. 2011;6(8):e24507.
6. Imoto H, Sasaki N, Iwase M, Nakamura U, Oku M, Sonoki K, et al. Impaired insulin secretion by diphenyliodonium associated with perturbation of cytosolic Ca^{2+} dynamics in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2008;149(11):5391-400.
7. Torres N, Noriega L, Tovar AR. Nutrient modulation of insulin secretion. *Vitam Horm*. 2009;80:217-44.
8. Haber EP, Ximenes HM, Procópio J, Carvalho CR, Curi R, Carpinelli AR. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta-cells. *J Cell Physiol*. 2003;194(1):1-12.
9. Malaisse WJ. Insulin secretion: multifactorial regulation for a single process of release. The Minkowski award lecture delivered on September 7, 1972 before the European Association for the study of Diabetes at Madrid, Spain. *Diabetologia*. 1973;9(3):167-73.
10. Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(11):1323-67.
11. Augusto O. *Radicais Livres - Bons, Maus e Naturais*. São Paulo: Oficina de texto; 2006. 115 p.
12. I.B. Ae. *Signaling Mechanisms of Oxygen and Nitrogen Free Radicals* 2009.
13. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973;52(3):741-4.
14. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999;401(6748):79-82.
15. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*. 1999;274(52):37265-9.
16. Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. *Diabetes*. 2003;52(6):1457-63.
17. Syed I, Kyathanahalli CN, Jayaram B, Govind S, Rhodes CJ, Kowluru RA, et al. Increased phagocyte-like NADPH oxidase and ROS generation in type 2 diabetic ZDF rat and human islets: role of Rac1-JNK1/2 signaling pathway in mitochondrial dysregulation in the diabetic islet. *Diabetes*. 2011;60(11):2843-52.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

18. Li N, Li B, Brun T, Deffert-Delbouille C, Mahiout Z, Daali Y, et al. NADPH oxidase NOX2 defines a new antagonistic role for reactive oxygen species and cAMP/PKA in the regulation of insulin secretion. *Diabetes*. 2012;61(11):2842-50.
19. Rebelato E, Mares-Guia TR, Graciano MF, Labriola L, Britto LR, Garay-Malpartida HM, et al. Expression of NADPH oxidase in human pancreatic islets. *Life Sci*. 2012;91(7-8):244-9.
20. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):411-21.
21. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
22. Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*. 2004;76(4):760-81.
23. Pal R, Basu Thakur P, Li S, Minard C, Rodney GG. Real-time imaging of NADPH oxidase activity in living cells using a novel fluorescent protein reporter. *PLoS One*. 2013;8(5):e63989.
24. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):181-9.
25. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2006;126(1):205-18.
26. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223.
27. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, et al. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet*. 1995;9(2):202-9.
28. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, et al. Cloning the gene for an inherited human disorder—chronic granulomatous disease—on the basis of its chromosomal location. *Nature*. 1986;322(6074):32-8.
29. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int*. 2011;79(9):944-56.
30. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(6):453-71.
31. Taylor-Fishwick DA. NOX, NOX Who is There? The Contribution of NADPH Oxidase One to Beta Cell Dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:40.
32. Uchizono Y, Takeya R, Iwase M, Sasaki N, Oku M, Imoto H, et al. Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci*. 2006;80(2):133-9.
33. Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F, Graciano MF, Oliveira-Emilio HR, Hirata AE, et al. Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2009;150(5):2197-201.
34. Jaquet V, Scapozza L, Clark RA, Krause KH, Lambeth JD. Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(10):2535-52.
35. Graciano MF, Santos LR, Curi R, Carpinelli AR. NAD(P)H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets. *J Cell Physiol*. 2011;226(4):1110-7.

36. Santos LR, Rebelato E, Graciano MF, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR. Oleic acid modulates metabolic substrate channeling during glucose-stimulated insulin secretion via NAD(P)H oxidase. *Endocrinology*. 2011;152(10):3614-21.
37. Xiang FL, Lu X, Strutt B, Hill DJ, Feng Q. NOX2 deficiency protects against streptozotocin-induced beta-cell destruction and development of diabetes in mice. *Diabetes*. 2010;59(10):2603-11.
38. Weaver JR, Holman TR, Imai Y, Jadhav A, Kenyon V, Maloney DJ, et al. Integration of pro-inflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;358(1):88-95.
39. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, et al. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia*. 2007;50(2):359-69.
40. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R, et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia*. 2009;52(12):2489-98.
41. Anvari E, Wikström P, Walum E, Welsh N. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. *Free Radic Res*. 2015;49(11):1308-18.
42. Weaver JR, Grzesik W, Taylor-Fishwick DA. Inhibition of NADPH oxidase-1 preserves beta cell function. *Diabetologia*. 2015;58(1):113-21.
43. Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J*. 1981;199(2):393-8.
44. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):463-6.
45. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997;46(11):1733-42.
46. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*. 2013;1(1):244-57.
47. Peskin AV, Winterbourn CC. Taurine chloramine is more selective than hypochlorous acid at targeting critical cysteines and inactivating creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(1):45-53.
48. Laclau M, Lu F, MacDonald MJ. Enzymes in pancreatic islets that use NADP(H) as a cofactor including evidence for a plasma membrane aldehyde reductase. *Mol Cell Biochem*. 2001;225(1-):151-60.
49. Godoy JR, Funke M, Ackermann W, Haunhorst P, Oesteritz S, Capani F, et al. Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(1):2-92.
50. Bensellam M, Van Lommel L, Overbergh L, Schuit FC, Jonas JC. Cluster analysis of rat pancreatic islet gene mRNA levels after culture in low-, intermediate- and high-glucose concentrations. *Diabetologia*. 2009;52(3):463-76.

51. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch*. 2010;460(4):703-18.
52. Hinke SA, Hellemans K, Schuit FC. Plasticity of the beta cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic beta cell for the next meal. *J Physiol*. 2004;558(Pt 2):369-80.
53. Fridlyand LE, Philipson LH. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells? *Diabetes*. 2004;53(8):1942-8.
54. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2007;56(7):1783-91.
55. Ježek P, Dlasková A, Plecítá-Hlavatá L. Redox homeostasis in pancreatic β cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:932838.
56. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000;49(11):1751-60.
57. Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest*. 2003;33(9):742-50.
58. MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ, Hasan NM, Buss JD, Kendrick MA. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(1):E1-15.
59. Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renström E, et al. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes*. 2005;54(7):2132-42.
60. Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky KS, Roe MW, Philipson LH. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9796-801.
61. Roma LP, Duprez J, Takahashi HK, Gilon P, Wiederkehr A, Jonas JC. Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentration and glutathione redox state in rat pancreatic β -cells using ratiometric fluorescent proteins: confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1. *Biochem J*. 2012;441(3):971-8.
62. Broniowska KA, Mathews CE, Corbett JA. Do β -cells generate peroxynitrite in response to cytokine treatment? *J Biol Chem*. 2013;288(51):36567-78.
63. Schwarzländer M, Dick TP, Meye AJ, Morgan B. Dissecting Redox Biology using Fluorescent Protein Sensors. *Antioxid Redox Signal*. 2015.
64. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(1-2):146-59.
65. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227-31.
66. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-55.
67. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(41):15038-43.

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

86. Pascal SM, Veiga-da-Cunha M, Gilon P, Van Schaftingen E, Jonas JC. Effects of fructosamine-3-kinase deficiency on function and survival of mouse pancreatic islets after prolonged culture in high glucose or ribose concentrations. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(3):E586-96.
87. Maechler P. Mitochondrial function and insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;379(1-2):12-8.
88. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia.* 2009;52(5):739-51.
89. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 2007;56(7):1783-91.
90. Khaldi MZ, Guiot Y, Gilon P, Henquin JC, Jonas JC. Increased glucose sensitivity of both triggering and amplifying pathways of insulin secretion in rat islets cultured for 1 wk in high glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(2):E207-17.
91. Gilon P, Henquin JC. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca²⁺ concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem.* 1992;267(29):20713-20.
92. Reinbothe TM, Ivarsson R, Li DQ, Niazi O, Jing X, Zhang E, et al. Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion. *Mol Endocrinol.* 2009;23(6):893-900.
93. Shao D, Segal AW, Dekker LV. Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett.* 2003;550(1-3):101-6.
94. Shen EZ, Song CQ, Lin Y, Zhang WH, Su PF, Liu WY, et al. Mitoflash frequency in early adulthood predicts lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2014;508(7494):128-32.
95. Schwarzländer M, Wagner S, Ermakova YG, Belousov VV, Radi R, Beckman JS, et al. The 'mitoflash' probe cpYFP does not respond to superoxide. *Nature.* 2014;514(7523):E12-4.
96. Curnutte JT, Erickson RW, Ding J, Badwey JA. Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *J Biol Chem.* 1994;269(14):10813-9.
97. Oliveira HR, Curi R, Carpinelli AR. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Physiol.* 1999;276(2 Pt 1):C507-10.
98. Stiernet P, Guiot Y, Gilon P, Henquin JC. Glucose acutely decreases pH of secretory granules in mouse pancreatic islets. Mechanisms and influence on insulin secretion. *J Biol Chem.* 2006;281(31):22142-51.
99. Roma LP, Duprez J, Jonas JC. Glucokinase activation is beneficial or toxic to cultured rat pancreatic islets depending on the prevailing glucose concentration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(7):E632-9.
100. Jonas JC, Bensellam M, Duprez J, Elouil H, Guiot Y, Pascal SM. Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11 Suppl 4:65-81.
101. Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;364(1-2):1-27.
102. Kong X, Yan D, Wu X, Guan Y, Ma X. Glucotoxicity inhibits cAMP-protein kinase A-potentiated glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *J Diabetes.* 2015;7(3):378-85.

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