

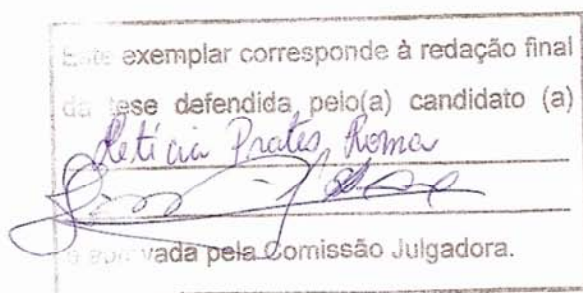
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Leticia Prates Roma

**“Mecanismos Moleculares do Efeito Citotóxico da Dexametasona em
Linhagens de Célula Beta e Ilhotas Pancreáticas”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia .

Orientador: Prof. Dr. Kléber Luiz de Araújo e Souza

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

R66m

Roma, Leticia Prates

Mecanismos moleculares do efeito citotóxico da dexametasona em linhagens de célula beta e ilhotas pancreáticas / Leticia Prates Roma. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Kléber Luiz de Araújo e Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células secretoras de insulina. 2. Estresse oxidativo. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Corticosteróides. 5. Insulina - Secreção. I. Souza, Kleber Luiz de Araújo e. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Molecular mechanisms of the cytotoxic effect of dexamethasone in insulin producing cells and pancreatic islets.

Palavras-chave em inglês: Insulin-secreting cells; Oxidative stress; Hydrogen peroxide; Adrenocortical hormones; Insulin - Secretion.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Kléber Luiz de Araújo e Souza, Eliana Pereira Araújo, Leonardo dos Reis Silveira, Marcos Hikari Toyama, Silvana Bordin.

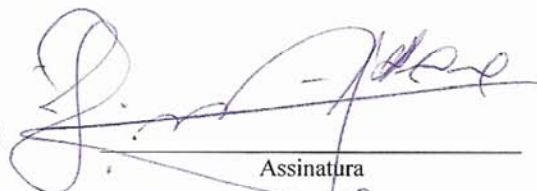
Data da defesa: 19/03/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 19 de março de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Kléber Luiz de Araújo e Souza (Orientador)



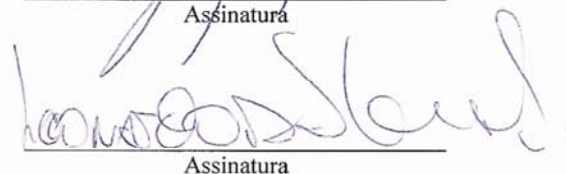
Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira



Assinatura

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama



Assinatura

Prof(a). Dr(a). Eliana Pereira de Araújo



Assinatura

Prof(a). Dr(a) Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Assinatura

Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Assinatura

Prof(a). Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Agradecimentos

Durante todo o período do doutorado, muitas pessoas me ajudaram, de diferentes formas, mas cada uma contribuiu para a realização dessa tese. Primeiramente, eu gostaria de agradecer ao Dr. Kléber Luiz de Araújo e Souza, pela orientação, ajuda nos experimentos, pela oportunidade e aprendizado durante o doutorado. Gostaria também de agradecer aos professores Boschero, Everardo e Helena, pela oportunidade de trabalhar nesse grupo e pelo exemplo diário de dedicação à pesquisa. Em especial à professora Helena, por toda a ajuda e confiança durante o PED. Ao professor Sigurd Lenzen e Dra. Ewa Gurgul-Convey, (Hannover, Alemanha) pelo apoio ao longo do projeto. A todos os amigos do laboratório, pela convivência amigável, pelas conversas, ajuda, happy hours. Em especial ao velho quarteto fantástico, que vai deixar muitas saudades. Agradeço aos professores, amigos do departamento e aos funcionários pela ajuda. Aos professores da banca pela disponibilidade e atenção.

Agradeço também a todas as minhas grandes amigas de coração (que moram longe e perto), por todo o apoio durante o tempo que passei aqui, ausente e mesmo assim é como se eu nunca tivesse saído de casa. Obrigada pelas mensagens, e-mails, visitas e preocupação constantes. A saudade é sempre grande. Obrigada à minha segunda família, Ana Carolina, Érica, Bete, Osvaldo, pelos ótimos finais de semana, por toda a atenção, preocupação e ao Danilo, por ter feito meses valerem por anos e cada dia especial. Aos meus pais, tia e irmãos por tudo. O apoio incondicional, a ajuda em todos os momentos difíceis, a paciência e boas palavras nas horas que precisei e a alegria por cada vitória. Obrigada por sempre fazerem os meus sonhos e objetivos os de vocês. Sou eternamente grata e **AMO TODOS** imensamente.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
1 - Introdução.....	1
2 - Objetivos.....	16
3 – Artigo 1.....	18
4 – Artigo 2.....	46
5 - Discussão.....	73
6 - Conclusão.....	84
7 - Referências Bibliográficas.....	86

Resumo

Introdução/Objetivos. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) faz parte de diversos processos fisiológicos. Nos últimos anos, o aumento de EROs têm sido associado ao desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas o Diabetes Mellitus Tipo 2. As células beta pancreáticas são notadamente mais suscetíveis ao estresse oxidativo devido a sua baixa capacidade antioxidativa, resultado da menor expressão e atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e peroxidases. A dexametasona, um glicocorticóide sintético, tem efeitos diabetogênicos e citotóxicos em células produtoras de insulina e ilhotas pancreáticas. Entretanto, os mecanismos pelos quais a dexametasona atua sobre as células-alvo não estão bem esclarecidos. Dessa forma, nosso objetivo foi analisar se a dexametasona induz estresse oxidativo em células produtoras de insulina RINm5F e ilhotas pancreáticas. Utilizamos três modelos: 1) células RINm5F controle, que são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo; 2) células RINm5F superexpressando a enzima catalase (RINm5F.Cat), que são resistente ao estresse oxidativo e 3) ilhotas de ratos adultos cultivadas por 72 h com dexametasona (Dexa) e ilhotas tratadas concomitantemente com dexametasona e o antioxidante N-acetilcisteína (Dexa+NAC).

Resultados: Aumento na produção de EROs foi observado em células RINm5F tratadas com dexametasona. O tratamento com dexametasona aumentou a atividade/clivagem da caspase-3 e apoptose em células RINm5F após 3 dias de cultura. Expressão protéica e atividade de Cu/ZnSOD estava aumentada após o tratamento com dexametasona, enquanto que a expressão/atividade de MnSOD não foi modulada pelo corticóide. A superexpressão da catalase em linhagens de célula beta previniu todos os efeitos citotóxicos da dexametasona, inclusive a morte celular. Elevados níveis de Cu/ZnSOD podem favorecer o aumento na geração de EROs e conseqüentemente, apoptose. Da mesma forma, ilhotas tratadas com dexametasona apresentaram

aumento na produção de EROs, efeito que foi revertido quando as ilhotas foram tratadas concomitantemente com dexametasona e NAC. Redução na secreção de insulina estimulada por glicose foi observada em ilhotas cultivadas com dexametasona. O tratamento com dexametasona e NAC restaurou a secreção de insulina a níveis próximos aos controles. Uma menor produção de NAD(P)H no grupo Dexa foi observado, sendo que o grupo Dexa+NAC mostrou níveis semelhantes ao grupo controle. Não ocorreram diferenças nas concentrações intracelulares de cálcio estimulado por glicose em nenhum dos grupos. A dexametasona reduziu a expressão gênica da sinaptotagmina VII, enquanto no grupo Dexa+NAC houve um aumento da expressão desse gene em ilhotas pancreáticas. Interessantemente, o tratamento com NAC diminuiu a expressão gênica da Cu/ZnSOD. **Conclusões:** Nossos resultados indicam que as ações da dexametasona em células produtoras de insulina e ilhotas pancreáticas são mediadas através do aumento do estresse oxidativo, sendo a Cu/ZnSOD importante nesse processo. A superexpressão da catalase e o uso do antioxidante n-acetilcisteína previnem contra os efeitos citotóxicos do glicocorticóide.

Abstract

Introduction/Aims: Reactive oxygen species (ROS) play a dual role on living organisms, being involved in many physiological processes and also being linked to the development of several pathologies, including the type 2 diabetes mellitus. Pancreatic beta cells are very sensitive to oxidative stress because of their low antioxidant capacity, which results from their low expression and activity of antioxidant enzymes, especially peroxidases. Dexamethasone is a synthetic diabetogenic glucocorticoid that induces cytotoxic effects on pancreatic beta cells. However, the precise mechanisms of dexamethasone toxicity on target cells are not fully understood. The aim of the present study was to analyze whether dexamethasone induces oxidative stress in insulin-producing cells and pancreatic islets. **Experimental design:** The experiments were performed using 3 models: 1) RINm5F control cells, extremely sensitive to oxidative stress; 2) RINm5F cells overexpressing the enzyme catalase (RINm5F.Cat), very resistant to oxidative stress and 3) rat pancreatic islets cultured for 72 h with dexamethasone (Dexa) or cultured concomitantly with dexamethasone and the antioxidant N-acetylcysteine (Dexa+NAC). **Results:** An increased generation of reactive oxygen species (ROS) was observed in dexamethasone-treated insulin-producing cells together with an increase in caspase-3 activity and apoptosis rate. Interestingly, exposure to dexamethasone increased the cytosolic superoxide dismutase Cu/ZnSOD protein expression and activity, while the mitochondrial MnSOD isoform was not affected by the glucocorticoid. Overexpression of catalase in insulin-producing cells prevented all the cytotoxic effects of dexamethasone. Pancreatic islets cultured in the presence of dexamethasone (Dexa) for 72 h showed increased ROS production. Glucose-stimulated insulin secretion was decreased after Dexa treatment. Intracellular ROS levels were decreased and the insulin secretion capacity

was recovered by concomitant treatment with Dexa+NAC. The total insulin content and intracellular Ca^{+2} levels were not modulated in either Dexa or Dexa+NAC groups. There was a decrease in the NAD(P)H production rate, used as an indicator of viability, after dexamethasone treatment. Concomitant incubation with NAC returned viability to control levels. Dexamethasone also decreased SYT VII gene expression; in contrast, the Dexa+NAC group showed increased expression of SYT VII compared to controls. Surprisingly, treatment with NAC decreased the gene expression of the antioxidant enzyme, Cu/ZnSOD. **Conclusions:** The cytotoxic effects of dexamethasone in RINm5F insulin-producing cells and pancreatic islets are primarily ROS-mediated. High levels of expression and activity of the Cu/ZnSOD might favour the generation of ROS. The overexpression of catalase and the use of the antioxidant N-acetylcysteine counteract the cytotoxic effects of dexamethasone.

I – Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

A terminologia “radical livre” era inicialmente utilizada na química orgânica e inorgânica para descrever compostos intermediários. Conhecidos desde início do século 20, apenas em 1954 foi proposta a ação desses compostos como moléculas biológicas responsáveis por processos deletérios nas células (Harman, 1957; Kohen e Nyska, 2002; Bashan, Kovsky *et al.*, 2009). Dois anos mais tarde, foi sugerida a ação fisiológica desses radicais, em especial durante o processo de envelhecimento, o que levou a um grande número de pesquisas nessa área (Harman, 1956; 1981; Finkel e Holbrook, 2000). Hoje, sabemos que a produção de espécies reativas é parte integrante do metabolismo celular e faz parte de diversos processos fisiológicos e patológicos (Finkel e Holbrook, 2000; Vasconcelos, Goulart *et al.*, 2007), sendo as mais conhecidas as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs).

Desde o início do século 18, sabe-se dos papéis contraditórios do oxigênio (Finkel e Holbrook, 2000). Ao mesmo tempo em que é essencial à vida, é também uma substância tóxica (Gutteridge e Halliwell, 2000; Halliwell, 2007a). Assim como o oxigênio, todo composto que recebe elétrons é um agente oxidante e todo composto que doa elétrons é um agente redutor. Portanto, numa reação química, redução é quando um composto recebe um elétron e oxidação é quando ocorre a perda de um elétron. Em biologia, um agente redutor é conhecido como antioxidante e um agente oxidante é denominado pró-oxidante ou oxidante. Essas reações, conhecidas por balanço redox, são parte essencial de diversos processos bioquímicos celulares (Schafer e Buettner, 2001; Valko, Leibfritz *et al.*, 2007).

As EROs podem ser classificados em dois grupos:

- Radicais (também chamados radicais livres): apresentam pelo menos um elétron não pareado em sua camada de valência, o que resulta na alta reatividade dessas moléculas pela capacidade de doar ou receber outro elétron para atingir estabilidade.

- Não-radicais: são compostas por uma variedade de substâncias, algumas das quais altamente reativas, podendo ser produzidas em altas concentrações dentro da célula.

Na tabela abaixo encontram-se as principais EROs conhecidas:

Nome	Símbolo
Radicais	
Oxigênio (bi-radical)	$O_2^{\cdot\cdot}$
Ânion superóxido	$O_2^{\cdot-}$
Hidroxil	$OH^{\cdot}$
Peroxil	$ROO^{\cdot}$
Alkoxil	$RO^{\cdot}$
Óxido Nitrico	$NO^{\cdot}$
Não radicais	
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2
Peroxinitrito	$ONOOH$
Ácido hipocloroso	$HOCL$
Ozônio	O_3
Aldeído	$HCOR$
Oxigênio singlete	1O_2
Peróxido Orgânico	$ROOH$

As EROs e ERNs são moléculas sinalizadoras formadas durante diversas reações metabólicas dentro das células. Podem ainda ser resultado de exposição a produtos de origem externa e interna, como radiação, medicamentos, dieta; ou ainda hormônios, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, dentre outros (Bashan, Kovsan *et al.*, 2009). Em situações normais, quando ocorre excesso na produção dessas substâncias, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante. Um antioxidante, ou agente redutor pode ser definido como

um composto capaz de prevenir, atenuar ou remover moléculas pró-oxidantes evitando o dano oxidativo (Halliwell, 2007a). Portanto, o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, podendo resultar em danos à célula (Halliwell, 2007a; Valko, Leibfritz *et al.*, 2007). Entre os compostos antioxidantes estão enzimas, moléculas formadas em reações enzimáticas e compostos de origem intracelular e extracelular.

O balanço entre a atividade antioxidante e pró-oxidante é um processo finamente controlado e importante para a manutenção das funções celulares, sendo conhecido como potencial redox (Vasconcelos, Goulart *et al.*, 2007). Em situações de estresse oxidativo, ou seja, quando ocorre um aumento das espécies reativas formadas sem proteção intracelular eficiente, pode ocorrer o que se denomina de dano oxidativo (Kovacic e Jacintho, 2001; Valko, Rhodes *et al.*, 2006). Além das membranas que envolvem as células, organelas intracelulares como mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, são alvos do dano oxidativo. Esses efeitos deletérios ocorrem principalmente por oxidação de macromoléculas como proteínas, DNA e lipídios (Turrens, 2003; Robertson e Harmon, 2006).

As proteínas são importantes alvos do ataque de EROs. Além disso, as proteínas contêm sítios de ligação com metais, especialmente susceptíveis a reações de óxido-redução, e podem desencadear sinais os quais são reconhecidos por proteases e conseqüentemente degradar tais proteínas (Valko, Morris *et al.*, 2005). As proteínas ainda possuem muitos aminoácidos ou grupamentos (ex. sulfidril) que podem sofrer modificações e interações com radicais (Vasconcelos, Goulart *et al.*, 2007). Entre os danos finais estão alteração de atividades enzimáticas, mudança da estrutura terciária, degradação, fragmentação e funções celulares alteradas.

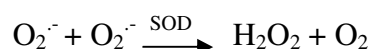
Os efeitos do dano oxidativo sobre os ácidos nucléicos consistem em ataque às bases purínicas e pirimídicas, podendo gerar modificações nas bases levando a mutações e apoptose,

quebra da cadeia do DNA, ligações cruzadas entre as fitas e danos aos mecanismos de reparo. Assim como as proteínas, o DNA também está ligado a metais, podendo ser danificado após a reações entre metais e EROs. (Kohen e Nyska, 2002; Bashan, Kovsky *et al.*, 2009). As reações entre lipídios e EROs podem ser chamadas de peroxidação lipídica (Halliwell, 2000). As principais conseqüências são alteração das propriedades físicas e químicas da membrana, alterando sua fluidez e permeabilidade, com risco de ruptura da membrana celular e de organelas e conseqüente morte celular. Além disso, a peroxidação lipídica leva à formação de outros compostos tóxicos como o malondialdeído que reage com DNA (Gutteridge e Halliwell, 2000).

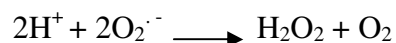
Como a maioria das espécies reativas formadas possui meia-vida extremamente pequena, elas interagem rapidamente com outras moléculas. Um exemplo, o radical hidroxil ($\text{OH}^\cdot$), permanece apenas 10^{-10} segundos em sistemas biológicos (Halliwell, 2007a; Valko, Leibfritz *et al.*, 2007). O tempo de vida de outras moléculas também é curto, porém esse tempo depende do meio e do local onde são produzidas, sendo influenciado pelo pH, e a presença de outras moléculas. Geralmente, moléculas com tempo de vida curto reagem no local onde são produzidas, enquanto moléculas com tempo de vida maior podem difundir dentro da célula e interagir em diferentes compartimentos celulares. Dessa forma, toxicidade não é relacionada com reatividade (Kohen e Nyska, 2002). Para prevenir a interação entre espécies reativas e alvos biológicos, o sistema antioxidante ou moléculas antioxidantes devem ser produzidos ou atuar em locais próximos a formação da molécula oxidante (Valko, Leibfritz *et al.*, 2007).

Ao mesmo tempo em que as células produzem constantemente moléculas pró-oxidativas, ela possui um sistema protetor capaz de neutralizar a formação e/ou atividade dessas espécies reativas (Gerschman, Gilbert *et al.*, 1954). Esse sistema de defesa é composto por enzimas antioxidantes capazes de detoxificar (eliminar, neutralizar) os radicais ou transformar espécies mais reativas em espécies menos reativas.

Entre as principais enzimas antioxidantes, encontramos a Superóxido Dismutase (SOD), que pode ser de 2 tipos: Cobre-zinco Superóxido Dismutase (Cu/ZnSOD ou SOD1) localizada no citoplasma e a Manganês Superóxido Dismutase (MnSOD, também conhecida como SOD2) presente na mitocôndria (Turrens, 2003). A SOD é responsável pela dismutação dos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como mostrado nas reações a seguir:



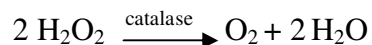
Ou ainda:



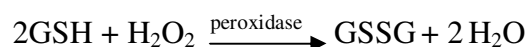
O radical $O_2^{\cdot-}$ não reage rapidamente com a maioria das moléculas biológicas, porém reage com outros radicais como NO, bem como resíduos de ferro presente em algumas enzimas (Lenzen, 2008). Pelo fato de $O_2^{\cdot-}$ não atravessar membranas facilmente, o radical que irá reagir com o O_2 deve ser produzido no mesmo compartimento ou difundir até este local. Em termos quantitativos, a cadeia respiratória mitocondrial é o local de maior importância na geração de $O_2^{\cdot-}$ (Green, Brand *et al.*, 2004).

O produto final da dismutação do $O_2^{\cdot-}$, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido continuamente em todas as células. Apesar de difundir facilmente dentro das células e entre as células, ele não é muito reativo (Finkel e Holbrook, 2000). Possui um papel de sinalizador intracelular em diversos tipos de células (Pi, Bai *et al.*, 2007), porém em concentrações micromolares pode ser citotóxico (Lenzen, 2008). O H_2O_2 é removido do meio intracelular por enzimas como a catalase e da família das peroxidases (glutathione peroxidase) (Fig. 1) (Morgan,

Rebelato *et al.*, 2009). A catalase está presente principalmente nos peroxissomos e citosol (Turrens, 2003; Newsholme, Haber *et al.*, 2007), e é responsável pela remoção de elevadas quantidades de H_2O_2 , devido ao seu elevado K_m , de acordo com a reação abaixo:



As glutathionas peroxidases (GPx) possuem alta afinidade e removem o H_2O_2 mesmo quando está presente em baixas concentrações. As moléculas doadoras de elétrons nesse caso são pequenas moléculas, como as glutathionas, sendo necessárias duas moléculas de glutathiona para a remoção de uma molécula de H_2O_2 . Para que ocorra essa reação é necessária a participação de outras moléculas como o NADPH, o qual é responsável pela regeneração da glutathiona oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) (Kohen e Nyska, 2002; Margis, Dunand *et al.*, 2008).



Esses eventos estão demonstrados na figura a seguir:

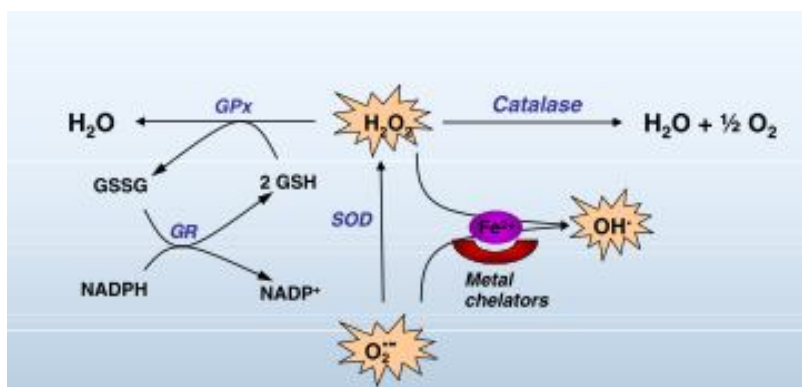
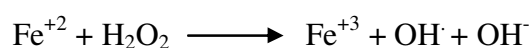


Figura 1: Sistema de enzimas antioxidantes. Adaptada do artigo: Bashan N, *et al.* . *Physiol Rev* 89:27-71, 2009.

Nos últimos anos, uma nova família de enzimas antioxidativas, as peroxirredoxinas, vêm sendo descritas e estudadas (Rhee, Kim *et al.*, 1994; Boscherio, Stoppiglia *et al.*, 2002; Kinnula, Paakko *et al.*, 2004). Estas proteínas têm atividade de peroxidase e para isso oxidam as tiorredoxinas e/ou glutatona. Por esse mecanismo estão primariamente envolvidas na conversão de H_2O_2 em H_2O (em uma definição mais geral, de grupos ROOH para ROH + H_2O). São constituídas por seis isoformas (Prdx1-6) as quais estão distribuídas nos mais diversos compartimentos celulares.

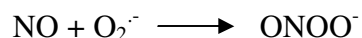
Outras moléculas participam do mecanismo antioxidante celular, chamadas antioxidantes de baixo peso molecular (Kohen e Nyska, 2002). As glutatonas (GSH), histidinas e urato são alguns exemplos dessas moléculas produzidas pelas células ou pelo metabolismo celular (Halliwell, 2007a; Bashan, Kovsky *et al.*, 2009). Entretanto, a maioria dos compostos antioxidantes de baixo peso molecular é adquirida através da dieta. Entre eles estão tocoferóis (ex. vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), (Bashan, Kovsky *et al.*, 2009) aminoácidos como a taurina (Haber, Lam *et al.*, 2003) e flavonóides (Finkel e Holbrook, 2000).

Apesar dos mecanismos de defesa antioxidante, existem situações onde a produção de espécies reativas supera a capacidade de remoção das mesmas. Ocorre também a formação de espécies reativas muito tóxicas, as quais as células não possuem defesa. Um exemplo é a formação do radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) a partir do H_2O_2 (Halliwell, 2007a). Essa reação é conhecida como Reação de Fenton e é uma das mais importantes reações intracelulares, devido ao fato do $\text{OH}^\cdot$ ser o radical mais reativo nos sistemas biológicos.



Espécies reativas de Nitrogênio

As principais espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são o Óxido Nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻) (Bashan, Kovsan *et al.*, 2009). NO reage lentamente com a maioria das moléculas biológicas, mas é altamente reativo com outros radicais livres. A reação mais importante é com O₂⁻ formando o radical mais tóxico ONOO⁻ (Lenzen, 2008).



O NO exerce papéis fisiológicos importantes, como vasodilatação endotelial e é considerado um “antioxidante” e antiinflamatório, pois inibe a ativação de NFκB pelo O₂⁻. Por outro lado, a nitrosilação de proteínas pode modificar suas funções e a formação de ONOO⁻ e outros radicais contendo NO podem ser potentes pró-oxidantes (Bashan, Kovsan *et al.*, 2009). O NO pode atravessar membranas e se difundir rapidamente dentro das células. É produzido através do L-arginina e essas reações são catalisadas através de enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintase (do inglês: Nitric Oxide Synthase ou NOS). Existem 3 tipos de NOS: induzida (iNOS), endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) (Kohen e Nyska, 2002). A formação de ONOO⁻, um radical altamente reativo, leva a reações com CO₂, prótons, grupamentos tióis, tirosina e outros aminoácidos além de metais de transição. As alterações mediadas pelo ONOO⁻ tornam esse radical o principal efector do estresse nitrosativo (Pacher, Beckman *et al.*, 2007).

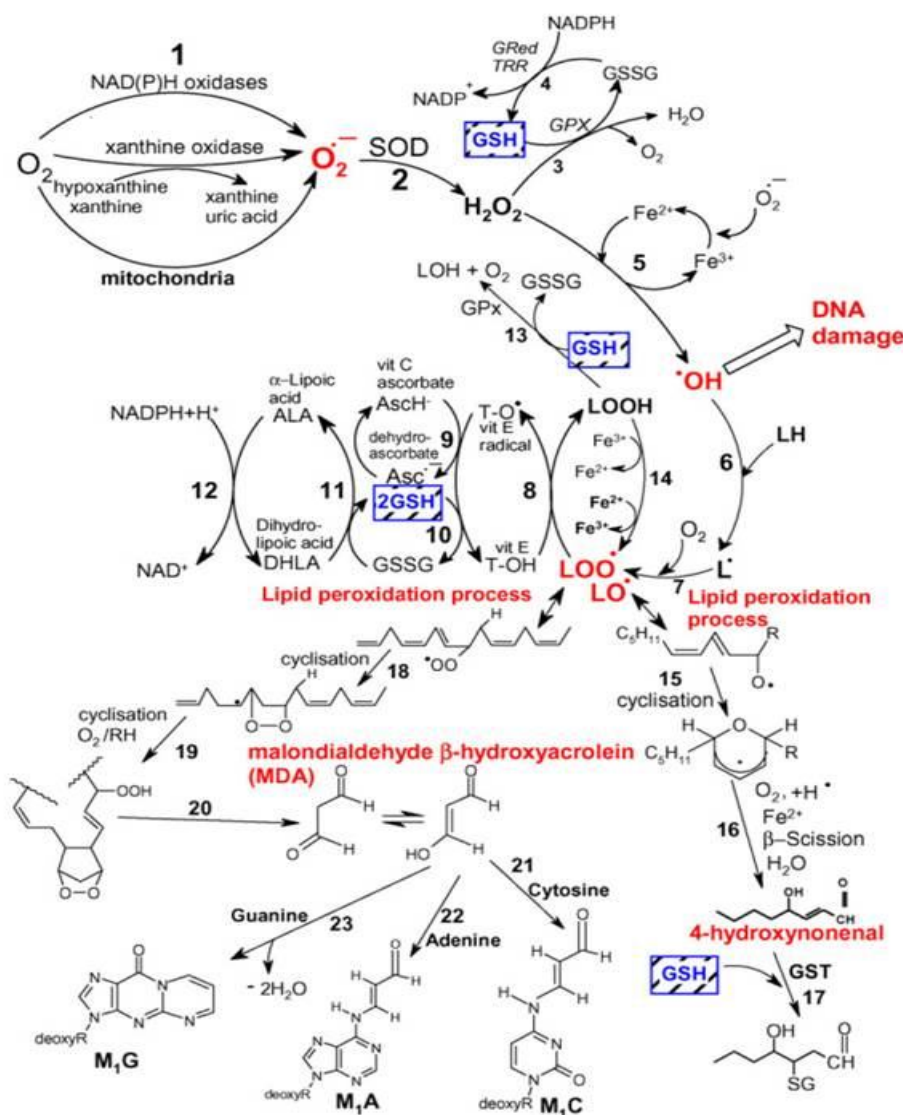


Figura 2: Figura adaptada do artigo M. Valko *et al.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39 (2007) 44–84. Reação 1: Formação de $O_2^{\bullet-}$. Reação 2: Dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD. Reação 3: Ação da GPx. Reação 4: GSSG é reduzida a GSH. Reação 5: Metais de transição (reação de Fenton). Reação 6: Radical hoidroxil e ácidos . Reação 7: Formação do radical peroxil ($LOO^{\bullet}$). Se esse radical não é reduzido por antioxidants ocorre as reações 18-23 e 15-17. Reação 8: Formação do radical Vitamina E (T-O $\bullet$). Reação 9: Regeneração da Vitamina E pela Vitamina C. Reação 10: Regeneração da Vitamina E pela GSH. Reação 11: GSSG é reduzida a GSH e AsCH. Reação 12: Regeneração de DHLA. Reação 13: Ação da GPx sobre hidroperoxidos de lípidios. Reação 14: Formação de radicais alcóxil (LO $\bullet$), ou peroxil ($LOO^{\bullet}$). Reação 15: LO forma anel de hidroperóxido. Reação 16: formação de compostos a partir do anel de hidroperóxido.

Estresse Oxidativo e Diabetes Mellitus tipo 2

Os danos causados por EROs têm sido relacionados a condições de inflamação, formação de tumores, envelhecimento, diabetes Mellitus entre outras doenças (Brownlee, 2005; Newsholme, Haber *et al.*, 2007).

Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) é uma doença metabólica caracterizada pela elevação da glicose sanguínea, mudanças no perfil lipídico e complicações vasculares, tendo como característica durante sua evolução, resistência à insulina e disfunção das células beta (Robertson, 1992b; Del Prato e Marchetti, 2004). Assim como em outras patologias, o desenvolvimento do DMT2 tem sido relacionado ao excesso na formação de EROs (Kajimoto e Kaneto, 2004).

De forma geral, a formação de espécies reativas está relacionada à menor secreção de insulina, menor expressão do gene da insulina e menor conteúdo total de insulina (Robertson, 1992a; Robertson e Harmon, 2006). Além disso, há evidências de que a produção de EROs tenha papel relevante no desenvolvimento da resistência à insulina sendo responsável pela menor captação de glicose no músculo (Blair, Hajduch *et al.*, 1999; Hansen, Ikeda *et al.*, 1999; Fridlyand e Philipson, 2006) e tecido adiposo (Houstis, Rosen *et al.*, 2006).

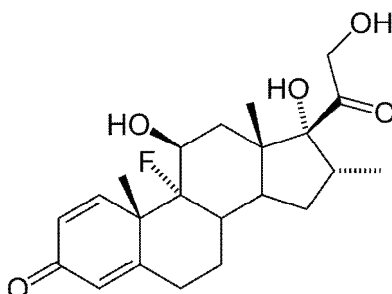
A célula beta utiliza principalmente o catabolismo da glicose para seu consumo energético, que inclui energia para a biossíntese e exocitose da insulina. Ao mesmo tempo, a célula beta gera, através do metabolismo, o sinal para a secreção de insulina (Lenzen, 2008). Resumidamente, a glicose entra na célula através do seu transportador de membrana GLUT2 (transportador de glicose 2) e é rapidamente fosforilada por uma glicocinase específica. O aumento do fluxo metabólico através da glicólise resulta em aumento nas taxas de produção de ATP (adenosina trifosfato) na mitocôndria, e conseqüente aumento na razão ATP/ADP (adenosina difosfato) no citoplasma, que leva ao fechamento de canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}). A retenção do K^+ leva à despolarização da membrana plasmática, abertura dos canais de

cálcio (Ca^{+2}) sensíveis à voltagem, influxo de Ca^{+2} extracelular e rápido aumento de Ca^{+2} intracelular. O Ca^{+2} ativa proteínas cinases, que ativam o processo de exocitose do grânulo de insulina (Boschero, 1996).

Comparada a outros tipos celulares, a célula beta possui características que a tornam mais susceptíveis aos danos oxidativos. O primeiro deles é a produção excessiva de EROs durante o metabolismo mitocondrial (Newsholme, Haber *et al.*, 2007). O alto fluxo metabólico através da cadeia respiratória em situações de alta concentração de glicose e lipídios (situação conhecida como glicolipototoxicidade) pode aumentar a formação de radicais O_2^- (Green, Brand *et al.*, 2004; Lenzen, 2008). Segundo, a célula beta possui baixa atividade de enzimas antioxidantes, sendo que a expressão de enzimas como catalase, glutathione peroxidase, tioredoxinas e SOD são menores quando comparados a outros tecidos (Lenzen, Drinkgern *et al.*, 1996; Tiedge, Lortz *et al.*, 1997). Outras razões é que o aumento do cálcio intracelular pode estimular a geração mitocondrial de EROs e via proteína cinase C (PKC) ativar NADPH-oxidase (Green, Brand *et al.*, 2004; Morgan, Oliveira-Emilio *et al.*, 2007). A NADPH oxidase é uma enzima associada à membrana da célula e é responsável pela produção de H_2O_2 (Morgan, Oliveira-Emilio *et al.*, 2007; Newsholme, Haber *et al.*, 2007). Dessa forma, é muito importante para a célula beta prevenir o excesso de formação de EROs, que facilmente podem superar sua baixa capacidade de defesa antioxidante. O aumento do estresse oxidativo seria responsável, em parte, pela falência da célula beta, apoptose e instalação do quadro de DM2 (i.e. menor secreção de insulina) (Kajimoto e Kaneto, 2004).

Glicocorticóides

Os glicocorticóides foram descobertos em 1940 por Hench e desde então são considerados antiinflamatórios potentes, sendo amplamente utilizados para o tratamento de diversas doenças. Os glicocorticóides são hormônios com atividade hiperglicemiante importante exercendo efeitos sobre a homeostasia metabólica celular tanto em condições normais quanto patológicas (Strack, Sebastian *et al.*, 1995). A dexametasona, um glicocortióide sintético, é muito utilizada no tratamento de processos alérgicos e inflamatórios graves. Sua formula $C_{22}H_{29}FO_5$ está representada na figura abaixo:



Apesar de sua eficácia, o uso prolongado ou excessivo de glicocorticóides pode desencadear diversos efeitos colaterais, entre eles estão: osteoporose, miopatias, aspecto cushingóide, alterações no metabolismo de lipídios e da glicose, diabetes mellitus tipo 2, risco de indução de catarata, problemas de crescimento, dentre outros.

Produzidos pelas glândulas adrenais e regulados pelo eixo hipotálamo-hipófise-glândulas adrenais, os glicocorticóides estão entre os primeiros hormônios identificados a exercerem seus efeitos após ligação proteína-DNA, através do receptor de glicocorticóide (GR) (Hollenberg, Weinberger *et al.*, 1985). Essas ações são influenciadas pela dose e tempo de exposição à droga

(Jeong, Oh *et al.*, 2001) Assim, doses baixas desencadeiam ações dependentes de modificação na expressão gênica, enquanto que doses altas podem acarretar as ações não-transcricionais (Buttgereit, Wehling *et al.*, 1998). A velocidade da resposta também é variada, sendo os efeitos de expressão gênica mais lentos, com pelo menos 30 minutos de ação, já que requerem passagem por diversas etapas metabólicas (Limboung e Liao, 2003).

Os glicocorticóides são hormônios lipossolúveis, sendo assim, atravessam facilmente a membranas celulares e ligam-se a receptores citoplasmáticos, os quais existem sob duas formas: alfa e beta. A forma alfa é funcionalmente ativa, já a forma beta é incapaz de se ligar ao hormônio e por isso atua como antagonista da forma alfa (Buttgereit, Wehling *et al.*, 1998). O receptor alfa, na sua forma inativa está ligado a proteínas de choque térmico (heat shock protein 70, 90). Após ligação do glicocorticóide ao receptor desfaz-se o complexo e o conjunto glicocorticóide-receptor, dimerizado, transloca-se para o núcleo celular e se liga a seqüências específicas presentes no DNA (Baraniuk, 1996) chamados elementos de resposta aos glicocorticóides (GREs) (Riccardi, Cifone *et al.*, 1999). Essa ligação inicia a transcrição de diversos genes e conseqüente síntese de várias proteínas. Os glicocorticóides também ativam outros fatores de transcrição e atuam através de interação proteína-proteína sem associação direta com o DNA (Stoecklin, Wissler *et al.*, 1997). Um exemplo deste mecanismo é a inibição pré-transcricional dos fatores de transcrição AP-1 (activating protein 1) e NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Jonat, Rahmsdorf *et al.*, 1990). Ocorre ainda ação deste hormônio pós-transcricional, desestabilizando o RNA mensageiro (RNAm) formado. Um exemplo deste tipo de mecanismo é a desestabilização do RNAm para a síntese da ciclooxigenase-2 (COX-2). Os glicocorticóides podem afetar também o transporte e a secreção de proteínas recém-formadas (Buttgereit, Wehling *et al.*, 1998).

Os glicocorticóides podem também estimular a sobrevivência em eritrócitos, neutrófilos e tecidos como glândula mamária, ovário e fígado (Amsterdam e Sasson, 2002). Ao mesmo tempo, induzem a morte celular em timócitos, sendo importantes imunossupressores. Assim, os glicocorticóides podem tanto induzir a morte ou sobrevivência celular, exercendo efeitos anti e pró-apoptóticos (Bloom, Chacko *et al.*, 2004). Outros genes também são modulados pela ação dos glicocorticóides, como por exemplo, genes do metabolismo energético (Mcewen, 1998). Em condições de excesso de glicocorticoide endógeno ou exógeno, instalam-se quadros de hiperglicemia, resistência à insulina e hiperinsulinemia (Lenzen e Bailey, 1984). Esse fenômeno é resultado da interação de diversos órgãos como pâncreas, fígado e o tecido adiposo. A identificação do receptor de glicocorticóides nas células beta pancreáticas sugere efeito direto sobre a secreção de insulina e na transcrição gênica, estimulando a expressão de alguns genes ou reprimindo outros (Jeong, Oh *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, tem aumentado as evidências que os glicocorticóides exercem suas ações através da formação de EROs nas células-alvo. Resultados em adipócitos isolados mostram que a menor captação de glicose após o tratamento com dexametasona é parcialmente revertida após o uso de antioxidantes ou superexpressão de enzimas antioxidantes. Esses dados sugerem a participação de EROs no desenvolvimento da resistência à insulina mediada por glicocorticóides. (Houstis, Rosen *et al.*, 2006). Não existem trabalhos relacionando estresse oxidativo e glicocorticóides em linhagens de células produtoras de insulina e ilhotas pancreáticas.

II – Objetivos

2.0 OBJETIVOS

- Este trabalho teve como objetivo estudar se a dexametasona induz estresse oxidativo em células produtoras de insulina RINm5F e ilhotas pancreáticas. Utilizamos três modelos: 1) células RINm5F controle, que são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo; 2) células RINm5F superexpressando a enzima catalase (denominadas “RINm5F.Cat”), que são resistente ao estresse oxidativo e 3) ilhotas de ratos adultos cultivadas com dexametasona e tratadas ou não com antioxidante N-acetilcisteína.

A metodologia utilizada e os resultados serão mostrados em dois artigos (a seguir) seguidos de discussão geral dos resultados.

- Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression. (Artigo submetido ao Free Radical Biology and Medicine).
- Effects of N-acetylcysteine on pancreatic islets injury following dexamethasone exposure. (Artigo em fase de submissão).

III – Artigo 01

Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression

Short title: Dexamethasone-induced beta-cell death

Leticia P. Roma ^a, Jose R. Bosqueiro ^b, Daniel A. Cunha ^a, Everardo M. Carneiro ^a, Ewa Gurgul-Convey ^c, Sigurd Lenzen ^c, Antonio C. Boschero ^a, Kleber L. A. Souza ^{a*}.

^a Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, Brazil.

^b Department of Physical Education, Sao Paulo State University, Bauru, SP, Brazil.

^c Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, Hannover, Germany.

*Corresponding author:

Dr. Kleber L. A. Souza
Institute of Biology
Department of Physiology and Biophysics
State University of Campinas (Unicamp)
Campinas, SP, Brazil – 13.083-970
Telephone: + 55-19-35216198
Fax: + 55-19-35216185
klasouza@unicamp.br and/or klasouza@gmail.com

ABSTRACT

Pancreatic beta cells are very sensitive to reactive oxygen species and this might play an important role in beta cell death in diabetes. Dexamethasone is a synthetic diabetogenic glucocorticoid, which impairs pancreatic beta cell function. Therefore the toxicity of dexamethasone in RINm5F insulin-producing cells was investigated in dependence on the expression level of the antioxidant enzyme catalase, which inactivates hydrogen peroxide. This was correlated with oxidative stress and cell death. An increased generation of reactive oxygen species (ROS) was observed in dexamethasone-treated cells together with an increase in caspase-3 activity and apoptosis rate. Interestingly, exposure to dexamethasone increased the cytosolic superoxide dismutase Cu/ZnSOD protein expression and activity, while the mitochondrial MnSOD isoform was not affected by the glucocorticoid. Catalase overexpression in insulin-producing cells prevented all the cytotoxic effects of dexamethasone. In conclusion, dexamethasone-induced cell death in RINm5F insulin-producing cells is ROS-mediated. High levels of expression and activity of the Cu/ZnSOD might favour the generation of ROS. Increased ROS scavenging capacity in insulin-producing cells, through overexpression of catalase, prevents dexamethasone-induced apoptosis.

Keywords: oxidative stress; corticoids; caspases; necrosis, insulin-secreting cells; Islets of Langerhans; drug effects; pharmacology; in vitro.

INTRODUCTION

Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid with a significant diabetogenic potency [1], primarily employed as an anti-inflammatory and immunosuppressant drug. Glucocorticoids have a pleiotropic action on the whole body and are essential for homeostasis and reaction of the organism to stress. The actions of glucocorticoids, including dexamethasone, on mammalian cells are largely dependent on the binding of the drug to intracellular glucocorticoid receptors, leading to changes in gene expression, thereby affecting many cellular functions [1, 2]. Inflammatory processes are involved in the etiopathology of type 1 (T1DM) and to a lesser extent of type 2 diabetes mellitus (T2DM) (for a review see [3, 4]). In T1DM, pancreatic islets are infiltrated by activated T-cells and macrophages, which release pro-inflammatory cytokines in the vicinity of pancreatic beta cells leading ultimately to cell death [5, 6]. Although some controversy exists, inflammatory processes may also be involved in T2DM, mainly because of hypothalamic and adipose tissue inflammation [7-9]. As a result, particularly due to glucolipotoxicity and oxidative stress, beta cell function deteriorates finally leading to cell death [4, 10].

Oxidative stress is a general term used to define the challenge of cells or tissues to high levels of reactive oxygen species (ROS) [11]. This can be due to overproduction of ROS in the cells or to the exposure of the cells to high external environmental levels of pro-oxidant compounds. When ROS production exceeds the scavenging capacity of the cells, they are damaged by the toxic effects of the reactive species on cellular structures such as lipids, DNA and proteins [11]. Pancreatic beta cells and insulin-producing cells are particularly sensitive to and are weakly protected against oxidative stress; especially the enzymatic capacity for hydrogen peroxide (H_2O_2) removal is low [12, 13].

In this study, we investigated whether dexamethasone induces oxidative stress and cell death in RINm5F cells insulin-producing and whether the deleterious effects could be reversed by improvement of the antioxidant defence status of the cells. For this purpose, a stable cell line overexpressing the enzyme catalase under the control of the CMV-promoter was generated and cells were exposed to dexamethasone in vitro for the analysis of cellular functions. Our results provide evidence that dexamethasone increases oxidative stress and apoptosis of RINm5F insulin-producing cells through increased generation of intracellular hydrogen peroxide, an effect that is suppressed by catalase overexpression.

MATERIALS and METHODS

Materials. All SDS-PAGE and immunoblotting equipment were from Bio-Rad systems (Richmond, CA, USA). The Ac-DEVD- ρ -NA was from Biosource International (Camarillo, CA, USA). Nitrocellulose membranes (Hybond N, 0.45 μ m) were from Amersham (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). RU486 was from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Anti-catalase (mouse monoclonal) antibody, RPMI 1640 medium, and dexamethasone were from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175) antibody was from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). Anti-Cu/ZnSOD antibody, a kind gift of Prof. L. A. Velloso (Campinas, Brazil), was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-MnSOD antibody, a kind gift of Prof. F. Langone (Campinas, Brazil), was from Calbiochem (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ, USA). Anti-iNOS (aa 781-798) antibody, a kind gift of Prof. A. Britto (Campinas, Brazil), was from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA). All other reagents were from Mallinckrodt Baker Chemicals, Inc. (Phillipsburg, NJ, USA).

Cell culture. RINm5F insulin-producing cells were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 10 mmol/l glucose, 5 % (v/v) FCS, penicillin, and streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C and 5 % CO₂. For analyses of dexamethasone toxicity, cells were plated at a density of 5 x 10⁵ per 50-mm plastic dish and allowed to attach for 12 h. Thereafter, cells were exposed to 1 µmol/l of dexamethasone for the desired period. This concentration was selected on the basis of pre-experiments (data not shown), in line with the concentration used in previous in vitro studies with RINm5F cells [14].

Overexpression of catalase. The pcDNA3 expression vector containing the human catalase gene has been previously described in detail [15]. Briefly, the vector construct was propagated in bacteria (Top10 E. coli, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and isolated using minipreps (PureLink™ Quick Plasmid, Invitrogen). RINm5F cells were transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen). Positive stable clones were selected through resistance against G-418 (500 µg/ml) (Invitrogen).

Western blot analyses. Control and dexamethasone-incubated cells were homogenised by sonication in ice-cold medium containing protease inhibitors and centrifuged at 12,000 g and 4°C for 10 min. Forty micrograms of protein from the supernatants were resolved by electrophoresis in 10 % SDS-polyacrylamide gel and electroblotted onto nitrocellulose membranes. After blocking in 5 % albumin solution overnight (except for MnSOD expression samples, which were blocked in 1 % gelatine), immunodetection was performed after 6 h incubation time with either a mouse monoclonal catalase antibody (1:1,000 dilution), a goat polyclonal Cu/ZnSOD antibody (1:500 dilution), a sheep monoclonal MnSOD antibody (1:500 dilution), a mouse monoclonal iNOS antibody (1:250 dilution), or a rabbit monoclonal cleaved caspase-3 antibody (1:500 dilution). Afterwards, membranes were exposed to 150 ng/ml specific secondary peroxidase-conjugated antibody (anti IgG (H+L)–HRP, Invitrogen) for 2 h at 22°C, and visualized through

chemiluminescence (SuperSignal, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA). The bands were quantified using the Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD, USA).

Determination of intracellular ROS by DCFH-DA fluorescence. Control and dexamethasone-treated cells were washed with Krebs-Hepes buffer and then trypsinized. Thereafter cells were placed in black-coloured costar plates and incubated in Krebs-Hepes buffer containing 10 $\mu\text{mol/l}$ of DCFH-DA for 30 min at 37°C. Fluorescence was detected at 460/530 nm excitation/emission using a microplate analyser (Fusion, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The resulting fluorescence was expressed as FU/ μg of protein.

Determination of nitric oxide production: The accumulated nitrite in the medium was measured using the Griess method, as previously described [16]. Measurements were made spectrophotometrically at an absorbance of 562 nm in a microplate using sodium nitrite solutions (0–0.6 $\mu\text{mol/l}$) as standards. The reliability of the method was previously tested using 60 U IL-1 β exposed cells as positive controls, which showed a $191 \pm 8 \%$ increase in nitrites compared to that found in the medium from control cells ($N = 5$, $p < 0.001$)

Superoxide dismutase activity. The xanthine/xanthine oxidase method was employed according to the instructions in the manual (Superoxide Dismutase Assay Kit, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). MnSOD activity was measured by inhibiting Cu/ZnSOD with NaCN, as previously described [15]. Forty micrograms of total protein from control and catalase overexpressing cells were used.

Catalase activity. Measurements were made as previously described in [15], using 8.8 mmol/l of starting H_2O_2 . Forty micrograms of total protein from controls and 4 μg from catalase overexpressing cells were used. H_2O_2 decay was monitored at A_{235} nm every 1 min for 15 min, and compared to a standard curve of H_2O_2 . A correction for the absorbance of the blank value

with protein only (without H₂O₂) was performed. Blank value absorbances were A₂₃₅=0.472 and A₂₃₅=0.119, for RINm5F control and RINm5F.Cat cells, respectively. Enzyme activities were normalised to protein content, as determined with the Bradford assay.

Glutathione peroxidase activity. Glutathione peroxidase activity was measured using the NADPH disappearance method. Briefly, cells were harvested and sonicated in 50 mmol/l potassium phosphate buffer (pH 7.0). After clearing debris by centrifugation at 13,000 g, 20 µg of the supernatant protein were incubated in costar plates containing phosphate buffer, 1 U of glutathione reductase, 10 mmol/l of reduced glutathione, 0.8 mmol/l of NADPH, and 12 mmol/l of tert-butyl-hydroperoxide in a total volume of 300 µl. Reactions were carried out at 25°C. NADPH utilisation was monitored at 365 nm every 1 min for 10 min in a plate reader spectrophotometer. All enzyme activities were normalised to protein content.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay. LDH activity in 15 µl cumulative culture medium (5 µl for each day of incubation) was determined by the NADH disappearance rate coupled to pyruvate reduction at A₃₄₀ nm, according to the manual instructions (LDH kinetic UV-method, Laborlab, Guarulhos, Brazil). The reliability of the method was tested using sonicated cells as positive controls, which showed a 408 ± 8 % increase in LDH activity compared to that found in the medium from control cells (N = 3, p < 0.001).

Caspase-3 activity assay. The colorimetric method of the cleavage of DEVD-p-NA was employed using 50 µl of the lysates (150 µg of protein), following the manual instructions (QuantiZyme, Biosource International, Camarillo, CA, USA). Cells were harvested after dexamethasone incubation.

Apoptosis and necrosis detection by flow cytometry. Cell death by apoptosis was quantified in control and dexamethasone-treated cells using annexin-V-FITC, concomitantly with necrosis

estimation by propidium-iodide staining (Invitrogen). Ninety microlitres of cell suspension (containing 1×10^6 cells/ml) were incubated with 2 μ l of annexin-V-FITC and 2.5 μ l of propidium-iodide. Cells were kept in the darkness for 15 min on an ice bath. Thereafter, 400 μ l of binding buffer were added to the cell suspension and promptly read in the cytometer (FACScalibur and CellQuest software, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired. Non-labelled cells were used as a negative control and for the determination of the gates. Apoptotic cells were expressed as a percentage of the total number of cells.

Statistics. All data are expressed as means $\pm$ SE. Statistical analyses were performed using Student's t test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's or Dunnett's test, as required. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Catalase protein expression and enzyme activity after stable overexpression in RINm5F insulin-producing cells. The efficiency of transfection was evaluated by protein expression and enzymatic activity levels. Catalase protein expression (Fig. 1) was increased more than 10-fold and catalase enzyme activity (Fig. 1) was 9 times higher in the catalase overexpressing cells (RINm5F.Cat) as compared to control cells (RINm5F).

Effect of dexamethasone on cellular redox status and on nitric oxide (NO) production in RINm5F insulin-producing cells. Dexamethasone (1 μ mol/l) exposure for 3 days at both 2.8 and 25 mmol/l glucose increased ROS production as measured by dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) oxidation in control (RINm5F; open bars) and catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat, black bars) (Fig. 2A). In the catalase-overexpressing RINm5F.Cat cells (black

bars) dexamethasone-induced ROS production was minor and significantly lower than that observed in the control RINm5F cells treated with dexamethasone (open bars) (Fig. 2A), demonstrating that catalase overexpression successfully prevented dexamethasone-induced ROS formation. Normalisation of fluorescence units to the total number of cells gave essentially the same results for all groups (data not shown). The glucocorticoid antagonist RU486 completely blocked the dexamethasone-induced ROS generation (supplementary Fig. S1), confirming that the cytotoxic effects of dexamethasone on RINm5F insulin-producing cells depends primarily on glucocorticoid receptor activation. Dexamethasone did not increase NO formation, as measured by nitrite accumulation in the cell culture medium (Fig. 2B) in both RINm5F control and RINm5F.Cat cells.

Effect of dexamethasone on the protein expression of enzymes involved in nitrosative and oxidative stresses in RINm5F insulin-producing cells. The time-dependent effects of dexamethasone treatment (1 $\mu\text{mol/l}$) on the protein expression of Cu/ZnSOD and MnSOD are shown in Fig. 3. There was a significant increase in Cu/ZnSOD protein expression in RINm5F control cells already after 24 h exposure to dexamethasone, which was sustained until 3 days of exposure (Fig. 3B). Such a significant increase was not observed in the catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat) (Fig. 3B), which showed higher expression of Cu/ZnSOD in the absence of dexamethasone compared to RINm5F control cells. No changes were found for MnSOD protein expression either in the control RINm5F or catalase-overexpressing RINm5F.Cat cells after exposure to dexamethasone (Fig. 3C). iNOS protein expression was not detectable at any of the time points tested (data not shown).

Effect of dexamethasone on SOD, catalase and glutathione peroxidase activities in RINm5F insulin-producing cells. Enzyme activities are shown in Table 1. Corroborating the protein expression results, dexamethasone (1 $\mu\text{mol/l}$) exposure for 3 days caused an increase in

Cu/ZnSOD activity while no differences were found for the activity of MnSOD. Catalase overexpression prevented the increase of Cu/ZnSOD activity induced by dexamethasone. The relative increase of Cu/ZnSOD protein and enzyme activity in RINm5F.Cat cells compared to RINm5F control cells is not deleterious, since a sufficiently high hydrogen peroxide scavenging capacity can compensate and cells may be beneficated by the high levels of SOD enzymes. Dexamethasone had no significant effect on catalase enzyme activity in control cells. In catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat) with a 9 times higher catalase enzyme activity dexamethasone caused a marginal reduction of enzyme activity by $8.2 \pm 0.6 \%$, which, however, did not grossly reduce the increased enzyme activity when compared to non-transfected control cells. Finally, dexamethasone exposure for 3 days had no significant effect on glutathione peroxidase enzyme activity in either control (RINm5F) or catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat) cells.

Effect of dexamethasone on cell death markers in RINm5F insulin-producing cells. A specific antibody for activated caspase-3, an effector caspase, was used as a marker of apoptosis (Fig. 4A, blots on the top). RINm5F cells exposed to dexamethasone ($1 \mu\text{mol/l}$) for 3 days showed a 2.5 ± 0.2 increase in cleaved caspase-3 expression levels compared to control (Fig. 4A). This was accompanied by a strong significant 2.9-fold increase in caspase-3 activity compared to cells grown in the absence of the glucocorticoid (Fig. 4B). These effects were completely suppressed in cells overexpressing catalase (Fig. 4A and 4B). Additionally, incubating RINm5F cells in the presence of the glucocorticoid antagonist RU486 greatly decreased dexamethasone-dependent caspase-3 activation (supplementary Fig. S2), indicating that caspase-3-dependent cell death largely depends on glucocorticoid receptor activation. There was no significant difference in LDH enzyme activity released into the culture medium, as an indicator of necrosis, between control and dexamethasone-incubated cells both in RINm5F control and catalase-overexpressing

cells (Fig. 4C), showing that the dexamethasone-induced cell death is apparently accomplished exclusively by apoptosis.

Effect of dexamethasone on apoptosis and necrosis in RINm5F insulin-producing cells. To provide further evidence that cells undergo apoptosis when exposed to dexamethasone and to test whether catalase overexpression protects the cells against dexamethasone-induced cytotoxicity, flow cytometry measurements were performed using annexin V-FITC as an apoptotic marker (Fig. 5A lower right quadrant and Fig. 5B) and propidium iodide as a marker for necrosis (Fig. 5A upper right quadrant). Dexamethasone (1 $\mu\text{mol/l}$) exposure for 3 days induced a 5.2 ± 0.7 -fold increase in the apoptosis rate in control cells (RINm5F), while in catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat) this effect of dexamethasone was prevented (Fig. 5B). No significant differences were found for necrotic cell death between control (RINm5F) and catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat) (Fig. 5A upper right quadrant), corroborating the LDH measurements.

DISCUSSION

Glucocorticoids have a multitude of effects on pancreatic beta cells [1]. Long-term exposure to glucocorticoids is associated with many diseases including diabetes [17]. A possible mechanism for toxicity on insulin-producing cells exposed to dexamethasone might be an increase in oxidative stress, since beta cells are particularly vulnerable to ROS [18]. To address this question, we used a RINm5F insulin-producing cell line stably overexpressing catalase, the enzyme inactivating hydrogen peroxide from the cytosolic compartment, in order to analyse whether this enzyme can provide protection against dexamethasone-mediated toxicity and whether this toxicity is mediated by oxidative stress. Our results show that dexamethasone increases oxidative stress in insulin-producing cells ultimately leading to apoptotic cell death, and point to an

important role of hydrogen peroxide and reactive species originating from hydrogen peroxide in death of insulin-producing cells exposed to glucocorticoids.

Since catalase-overexpressing RINm5F cells are not negatively affected by dexamethasone and as native RINm5F insulin-producing cells express very low levels of this enzyme and consequently low catalase enzyme activity [12, 13, 19], these results strongly indicate that dexamethasone toxicity is mediated by generation of ROS, resulting in increased hydrogen peroxide levels and the subsequent generation of hydroxyl radicals as a critical effector of this toxic effect [11]. Glucocorticoids have also been shown to increase oxidative stress in 3T3 adipocyte [20], and an improvement of the ROS scavenging capacity in these cells ameliorated the dexamethasone-induced insulin resistance. This is another indication for a participation of dexamethasone-induced ROS formation in the diabetogenic effects of glucocorticoids. Our results show that dexamethasone induces cell death through apoptosis, which confirms earlier observations in other cell lines [21]. Additionally, no evidence for necrosis was found in insulin-producing cells exposed to dexamethasone. Cell death through apoptosis only is an interesting observation since another hormone class, namely thyroid hormones, have also been shown to destroy insulin-producing cells in a similar manner [22]. On the other hand, it is at variance from chemical diabetogenic agents, namely alloxan and streptozotocin, which typically destroy insulin-producing cells through necrosis [23].

Dexamethasone does not cause nitrosative stress, but it increases significantly oxidative stress, as demonstrated in the present study. Therefore, it can be stated with certainty that dexamethasone-induced apoptosis is ROS-mediated. Oxidative stress may activate or block effector caspases, depending on the pathway that is activated [24]. While hydrogen peroxide may block activation of caspases by direct oxidation of essential cysteines groups [24, 25] it can also induce apoptosis by mitochondrial release of cytochrome c, activation of caspase-9 and, and subsequently

activation of effector caspases [24-27]. In the case of dexamethasone, our results demonstrate that activation rather than inhibition of caspase-3 and consequently upstream caspases prevails.

Dexamethasone slightly (less than 10 %) reduced catalase activity in cells with high hydrogen peroxide scavenging capacity (RINm5F catalase-overexpressing cells). However, in the RINm5F insulin-producing control cells, catalase and glutathione peroxidase expression levels are less than 5 % of those found in the liver and enzyme activities are also very much lower [12, 13]. The levels in pancreatic islets are similarly low [12, 13]. Therefore, this slight dexamethasone-induced reduction of catalase enzyme activity observed in catalase overexpressing cells is not of crucial importance for the toxic effects of the glucocorticoid in native insulin-producing cells, in particular in view of their extremely low catalase expression level. Hence, insulin-producing beta cells cannot inactivate hydrogen peroxide and therefore cannot prevent the generation of the highly toxic H_2O_2 -derived hydroxyl radical [18]. However, other cell types and tissues with high catalase expression levels might be potentially more prone to the reduction of catalase activity by dexamethasone.

Interestingly, dexamethasone significantly increased the protein expression and enzymatic activity of the cytosolic isoenzyme Cu/ZnSOD, which increases the capacity of the insulin-producing cells for hydrogen peroxide generation from superoxide radicals. Since dexamethasone did not affect the activity of the mitochondrial isoenzyme MnSOD the conclusion is allowed that dexamethasone increases hydrogen peroxide generation and hence cell damage primarily in the cytoplasm, which cannot be counteracted sufficiently by hydrogen peroxide removal in view of the limited enzymatic hydrogen peroxide inactivating activity in insulin-producing cells.

In summary, dexamethasone induces oxidative stress, ultimately causing death of the insulin-producing cells through apoptosis. An improvement of the antioxidant defence status of the

insulin-producing cells, which are particularly sensitive to oxidative stress due to the low enzymatic capacity for hydrogen peroxide removal [12, 13], can prevent the formation of toxic hydroxyl radicals [6, 18] thereby conferring resistance against glucocorticoid-mediated toxicity and cell death.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP. L.P. Roma was the recipient of a CAPES post-graduated fellowship. We thank Dr. M. C. Marcondes and Dr. S. Saad for allowing the use of the facilities of their laboratories, and Dr. N. Conran for English editing.

Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; RINm5F.Cat, catalase-overexpressing RINm5F cells; Dex, dexamethasone; p-NA, p-nitro aniline; CMV, cytomegalovirus

References

- [1] Lenzen, S.; Bailey, C. J. Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. *Endocr Rev* 5:411-434; 1984.
- [2] Clark, A. R.; Martins, J. R.; Tchen, C. R. Role of dual specificity phosphatases in biological responses to glucocorticoids. *J Biol Chem* 283:25765-25769; 2008.
- [3] Rizzo, G.; Fiorucci, S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 6:421-427; 2006.
- [4] Cnop, M.; Welsh, N.; Jonas, J. C.; Jorns, A.; Lenzen, S.; Eizirik, D. L. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2:S97-107; 2005.

- [5] Jorns, A.; Gunther, A.; Hedrich, H. J.; Wedekind, D.; Tiedge, M.; Lenzen, S. Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes* 54:2041-2052; 2005.
- [6] Souza, K. L.; Gurgul-Convey, E.; Elsner, M.; Lenzen, S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. *J Endocrinol* 197:139-150; 2008.
- [7] De Souza, C. T.; Araujo, E. P.; Bordin, S.; Ashimine, R.; Zollner, R. L.; Boschero, A. C.; Saad, M. J.; Velloso, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146:4192-4199; 2005.
- [8] Ahima, R. S.; Qi, Y.; Singhal, N. S. Adipokines that link obesity and diabetes to the hypothalamus. *Prog Brain Res* 153:155-174; 2006.
- [9] Jorns, A.; Rath, K. J.; Bock, O.; Lenzen, S. Beta cell death in hyperglycaemic *Psammomys obesus* is not cytokine-mediated. *Diabetologia* 49:2704-2712; 2006.
- [10] Robertson, R. P.; Harmon, J. S. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med* 41:177-184; 2006.
- [11] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press; 2007.
- [12] Lenzen, S.; Drinkgern, J.; Tiedge, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20:463-466; 1996.
- [13] Tiedge, M.; Lortz, S.; Drinkgern, J.; Lenzen, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742; 1997.
- [14] Sheader, E. A.; Benson, R. S.; Best, L. Cytotoxic action of methylglyoxal on insulin-secreting cells. *Biochem Pharmacol* 61:1381-1386; 2001.
- [15] Tiedge, M.; Lortz, S.; Munday, R.; Lenzen, S. Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 47:1578-1585; 1998.

- [16] Lortz, S.; Tiedge, M.; Nachtwey, T.; Karlsen, A. E.; Nerup, J.; Lenzen, S. Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes* 49:1123-1130; 2000.
- [17] Buckingham, J. C. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S258-268; 2006.
- [18] Lenzen, S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36:343-347; 2008.
- [19] Johansson, L. H.; Borg, L. A. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174:331-336; 1988.
- [20] Houstis, N.; Rosen, E. D.; Lander, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944-948; 2006.
- [21] Ranta, F.; Avram, D.; Berchtold, S.; Dufer, M.; Drews, G.; Lang, F.; Ullrich, S. Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. *Diabetes* 55:1380-1390; 2006.
- [22] Ximenes, H. M.; Lortz, S.; Jorns, A.; Lenzen, S. Triiodothyronine (T3)-mediated toxicity and induction of apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. *Life Sci* 80:2045-2050; 2007.
- [23] Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216-226; 2008.
- [24] Chandra, J.; Samali, A.; Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29:323-333; 2000.
- [25] Hampton, M. B.; Orrenius, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 414:552-556; 1997.
- [26] Matsura, T.; Kai, M.; Fujii, Y.; Ito, H.; Yamada, K. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Free Radic Res* 30:73-83; 1999.
- [27] Stridh, H.; Kimland, M.; Jones, D. P.; Orrenius, S.; Hampton, M. B. Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett* 429:351-355; 1998.

Legends to Figures and Tables

Figure 1. Catalase protein expression and enzyme activity after stable overexpression in RINm5F insulin-producing cells. Protein expression was measured by Western blotting (upper graph; representative blot of 6 independent experiments) and enzyme activity by spectrophotometrical assay (lower graph; N = 8) from control cells (RINm5F; open bar) and catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat, black bar). * $p < 0.001$; t-test.

Figure 2. Effect of dexamethasone on cellular redox status and on nitric oxide (NO) production in RINm5F insulin-producing cells. A) ROS production was measured by dichlorofluorescein (DCFH-DA) oxidation. Control (RINm5F; open bars) and catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat, black bars) were incubated for 3 days with or without 1 $\mu\text{mol/l}$ dexamethasone (Dex) and assayed in the presence of 2.8 or 25 mmol/l glucose. N = 7. Letters above respective bar indicate a significant difference ($p < 0.05$) compared against a RINm5F (2.8); b RINm5F (25); c RINm5F (2.8) + Dex; d RINm5F (25) + Dex; e RINm5F.Cat (2.8); f RINm5F.Cat (25); g RINm5F.Cat (2.8) + Dex; h RINm5F.Cat (25) + Dex; ANOVA followed by Bonferroni. B) Nitrite accumulation in the medium was used as an indicator for the nitric oxide production. A time course of dexamethasone exposure for control (RINm5F; open bars) and for catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat, black bars) is shown. N = 7.

Figure 3. Effect of dexamethasone on the protein expression of superoxide dismutase isoenzymes in RINm5F insulin-producing cells. Protein expression was measured by Western-blotting. Control (RINm5F; open bars) and catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat, black bars) were incubated for 0, 1, 2 or 3 days with or without 1 $\mu\text{mol/l}$ dexamethasone (Dex). A) representative blots from a time course of dexamethasone exposure. B) Mean values of Cu/ZnSOD expression normalised to the housekeeping protein alpha-tubulin. N = 7. C) Mean

values of MnSOD expression normalised to the housekeeping protein alpha-tubulin. N = 4. * $p < 0.05$ vs. RINm5F control; ANOVA followed by Dunnett.

Figure 4. Effect of dexamethasone on cell death markers in RINm5F insulin-producing cells. Control (RINm5F; open bars) and catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat, black bars) were exposed to 1 $\mu\text{mol/l}$ of dexamethasone for 3 days (Dex). Caspase-3 was measured in the cell lysates, LDH activity in the culture medium. A) Representative blots from 3 independent experiments for cleaved caspase-3 expression. B) Caspase-3 activity. N = 3. C) LDH activity. N = 8. * $p < 0.05$ vs. RINm5F and vs. RINm5F.Cat + Dex; ANOVA followed by Bonferroni.

Table 1. RINm5F cells insulin-producing overexpressing or not the catalase enzyme were exposed for 72 h to 1 $\mu\text{mol/l}$ of dexamethasone. Enzyme activities were made by spectrophotometrical assays. Data are mean $\pm$ SE. N = 11-15 for Cu/ZnSOD; N = 6 for MnSOD; N = 8 for catalase; N = 4 for GPx. * $p < 0.05$; t'test against respective controls.

Figure 5. Effect of dexamethasone on apoptosis and necrosis in RINm5F insulin-producing cells. Control (RINm5F) and catalase-overexpressing cells (RINm5F.Cat) were exposed to 1 $\mu\text{mol/l}$ of dexamethasone for 3 days (Dex). Cell death rates were measured by flow cytometry (FACS). Annexin staining was used as a marker for apoptosis (low right quadrant), propidium iodide as a marker for necrosis (upper right quadrant). A) Representative graphs from 4 experiments with annexin-FITC/propidium iodide labelled cells. B) Mean values of apoptosis rates. N = 4. * $p < 0.05$ vs. RINm5F and vs. RINm5F.Cat + Dex; ANOVA followed by Bonferroni.

Legends to supplementary Figures

Figure S1. Effect of dexamethasone on cellular redox status from RINm5F cells in the presence or absence of 1 $\mu\text{mol/l}$ of the glucocorticoid antagonist RU486. ROS production was measured by dichlorofluorescein (DCFH-DA) oxidation. Control (RINm5F) and RU486-treated RINm5F cells (RINm5F+RU486) were incubated for 3 days with or without 1 $\mu\text{mol/l}$ dexamethasone (Dex) and assayed in the presence of (2.8) or (25) mmol/l glucose. Blocking of glucocorticoid receptor activation prevents the dexamethasone-induced ROS production at both 2.8 and 25 mmol/l of glucose. $N = 4$. * $p < 0.05$ compared to all other groups at the same glucose concentration; ANOVA followed by Bonferroni.

Figure S2. Effect of dexamethasone on caspase-3 activity from RINm5F cells in the presence or absence of 1 $\mu\text{mol/l}$ of the glucocorticoid antagonist RU486. Caspase-3 was measured in the cell lysates using the DEVD cleavage method, which is a specific caspase-3 substrate. Control (RINm5F; open bars) and RU486-treated cells (RINm5F+RU486, black bars) were exposed to 1 $\mu\text{mol/l}$ of dexamethasone for 3 days (Dex). Blocking of glucocorticoid receptor activation strongly decreases caspase-3 activity as measured by the cleaved DEVD substrate. Optical density over the time for 5 independent experiments is shown. (■) RINm5F control cells, (▲) RINm5F cells treated with RU486, (▼) RINm5F cells exposed to dexamethasone, (●) RINm5F cells treated with RU486 and exposed to dexamethasone.

Figure 1

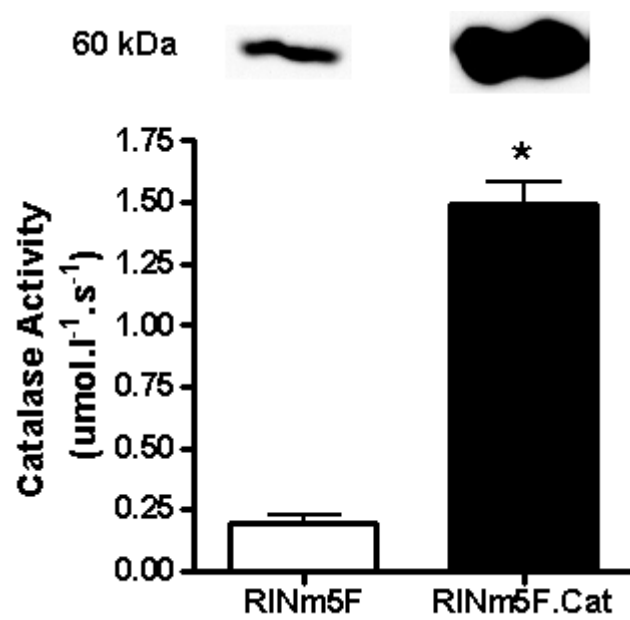


Figure 2

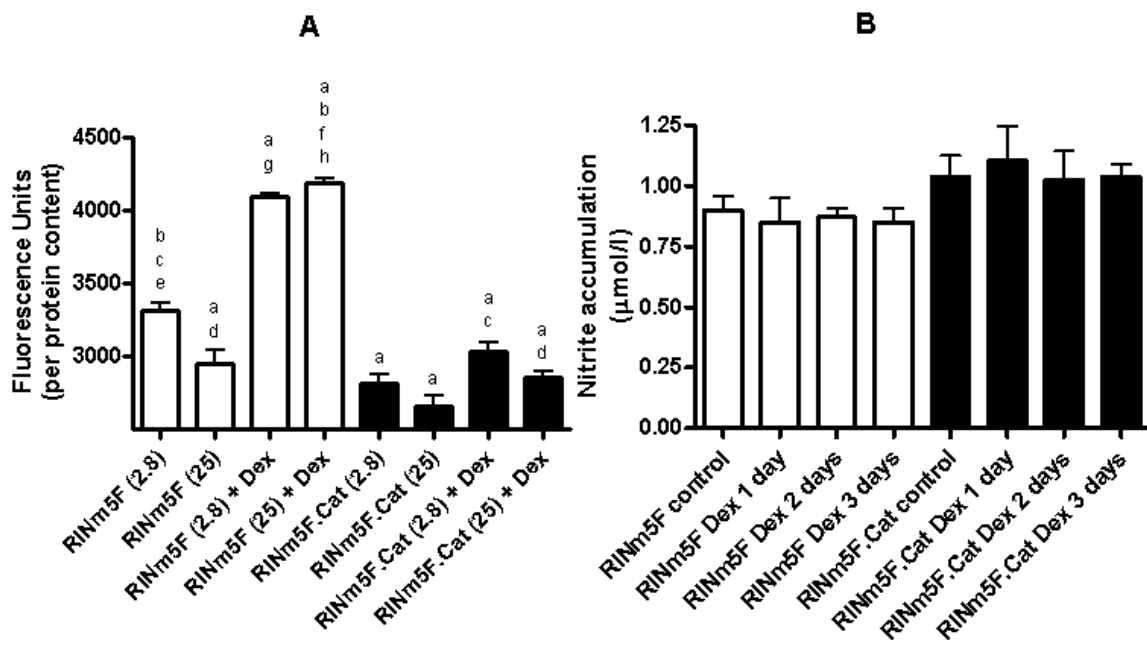


Figure 3.

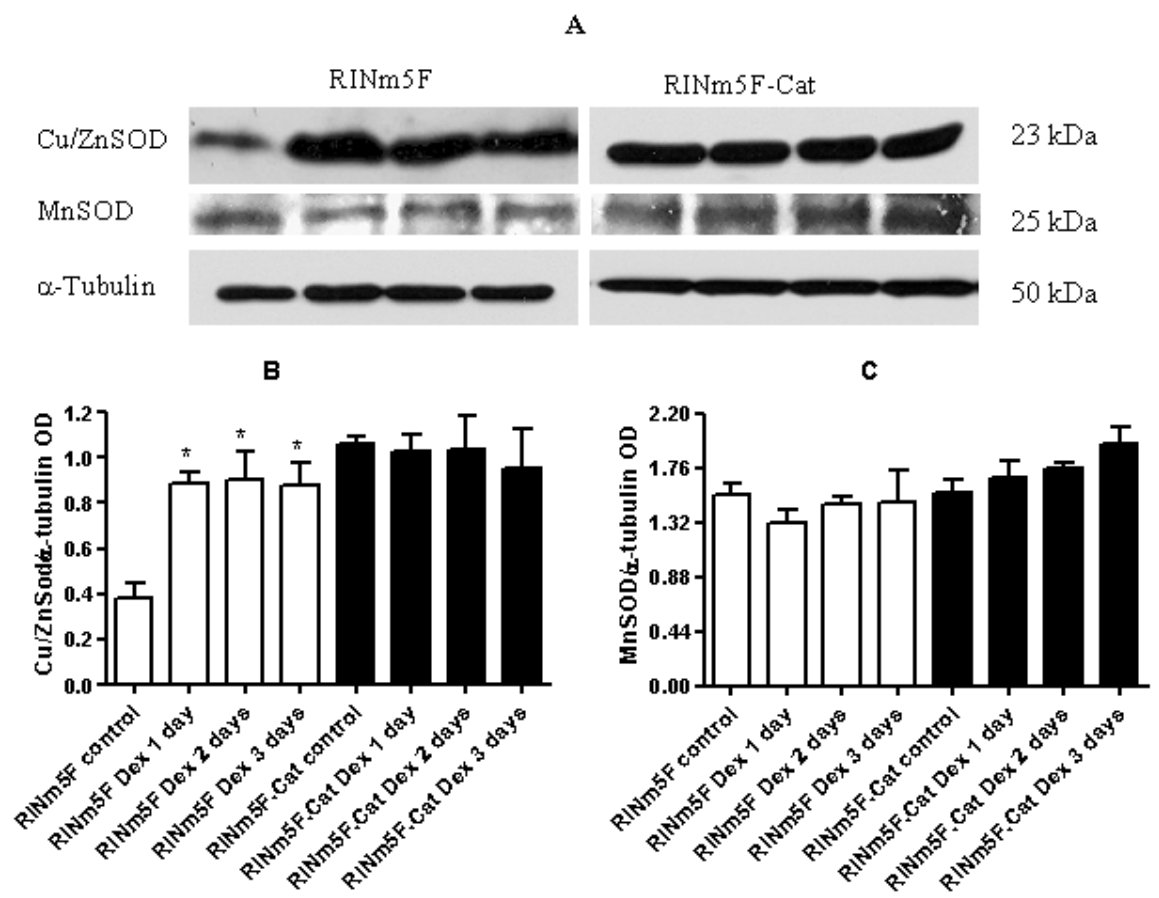


Table 1

Table 1

Table 1. Cu/ZnSOD, MnSOD, catalase and glutathione peroxidase (GPx) activities after exposure of RINm5F cells and RINm5F cells overexpressing catalase (RINm5F.Cat) to dexamethasone.

	Cu/ZnSOD (U/mg of protein)	MnSOD (U/mg of protein)	Catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein⁻¹)	GPx (nmol NADH.min⁻¹.mg of protein⁻¹)
RINm5F Control	48.8 $\pm$ 6.0	28.4 $\pm$ 1.8	3.2 $\pm$ 0.1	54.9 $\pm$ 4.6
RINm5F + Dex	78.9 $\pm$ 7.0 *	28.5 $\pm$ 3.3	3.0 $\pm$ 0.3	55.2 $\pm$ 4.1
RINm5F.Cat Control	72.0 $\pm$ 7.5	28.0 $\pm$ 2.2	29.5 $\pm$ 1.1	49.2 $\pm$ 0.6
RINm5F.Cat + Dex	83.7 $\pm$ 5.6	30.1 $\pm$ 4.5	27.1 $\pm$ 0.8 *	51.8 $\pm$ 3.0

Figure 4

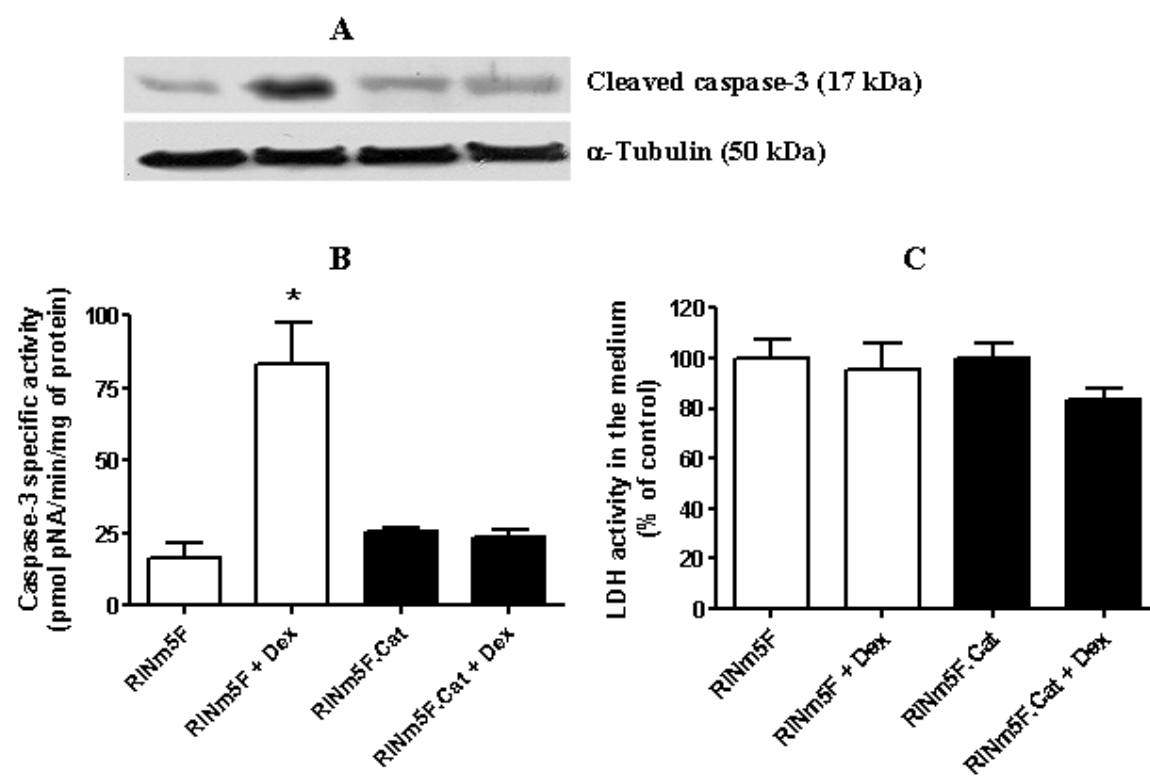


Figure 5

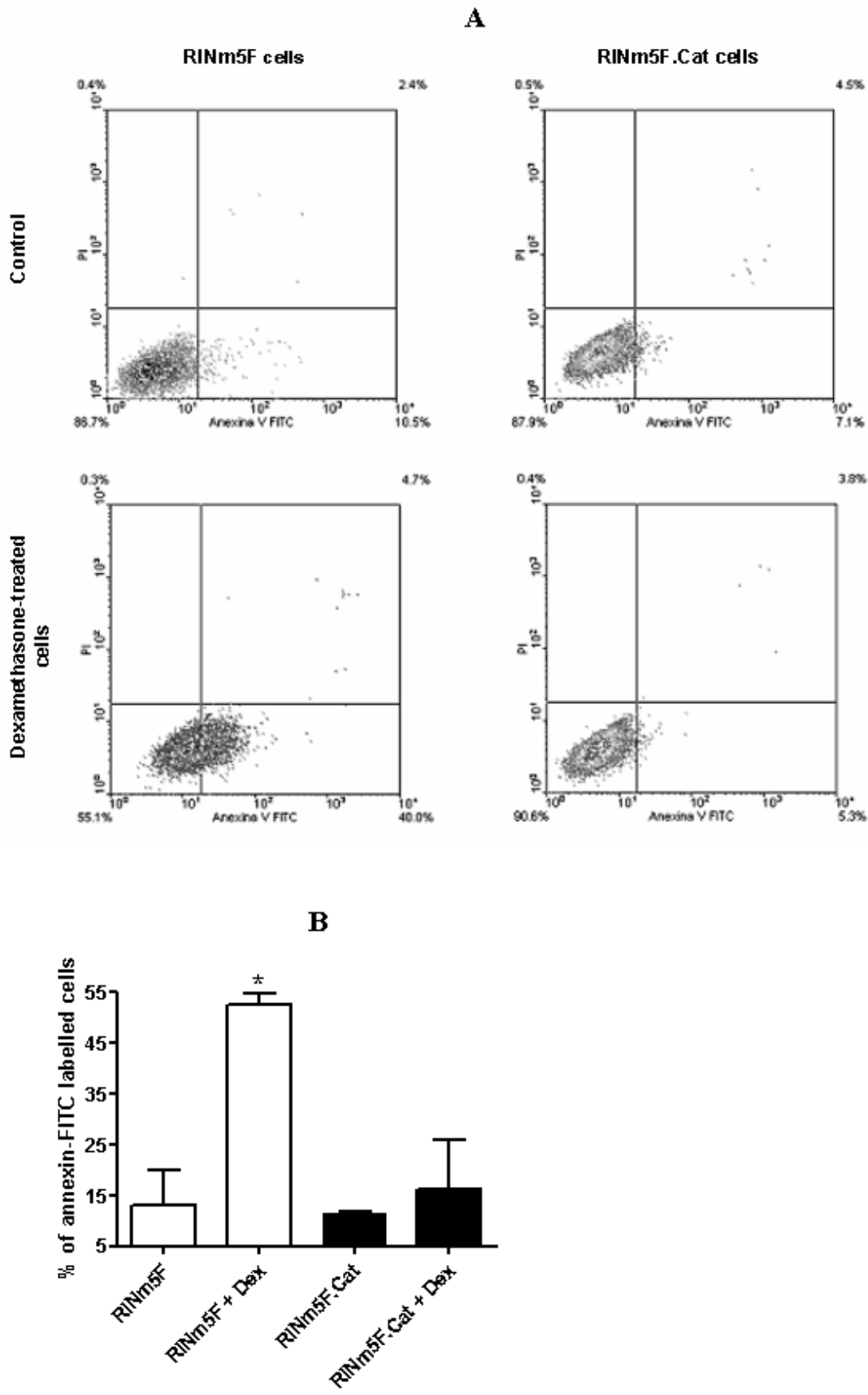


Figure S1

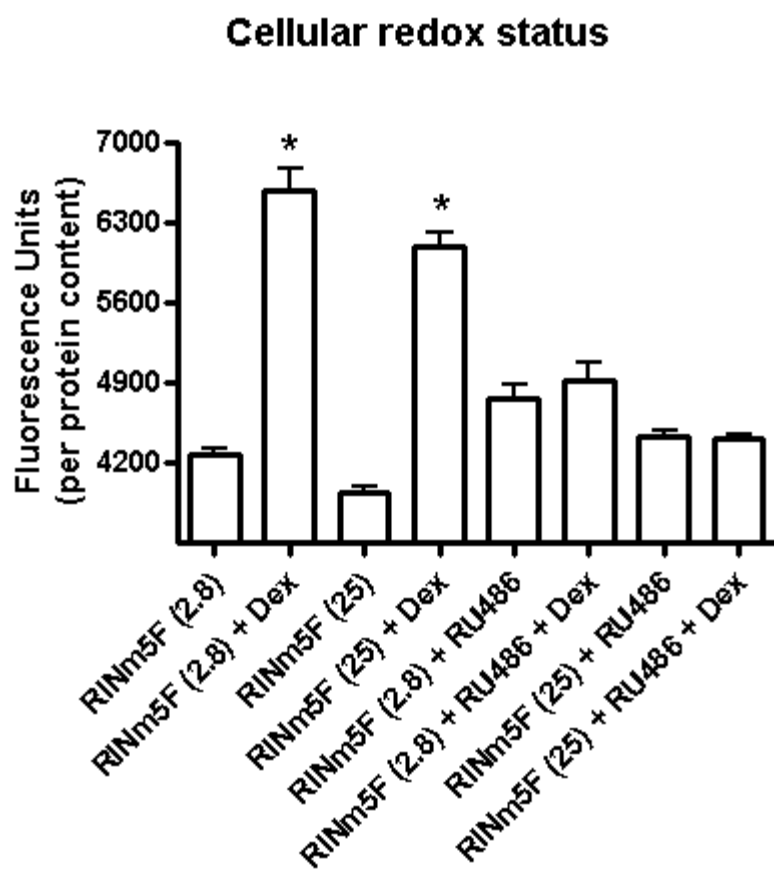
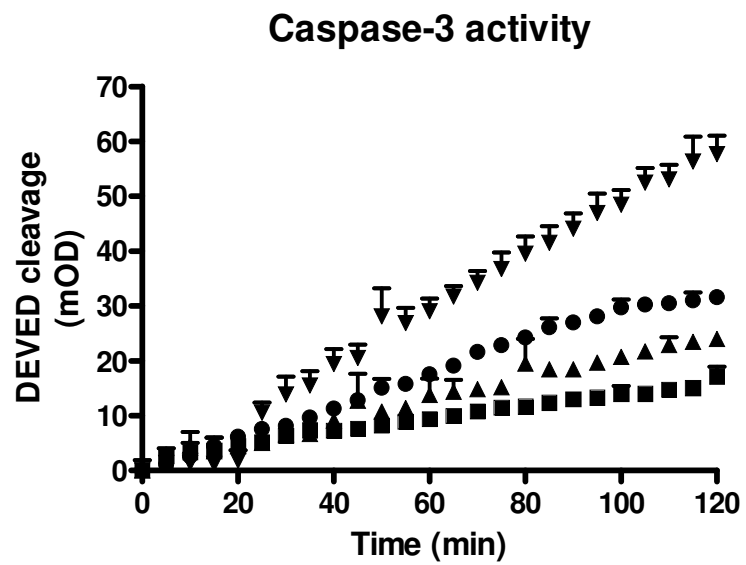


Figure S2



IV – Artigo 02

Effects of N-acetylcysteine on pancreatic islet injury following dexamethasone exposure.

Short title: Dexamethasone and pancreatic islet function

Letícia P. Roma, Camila A. M. Oliveira, Everardo M. Carneiro, Antonio C. Boschero, Kleber L. A. Souza *.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, Brazil

*Corresponding author:

Dr. Kleber L. A. Souza

Institute of Biology

Department of Physiology and Biophysics

State University of Campinas (Unicamp)

Campinas, SP, Brazil – 13.083-970

Telephone: + 55-19-35216198

Fax: + 55-19-35216185

klasouza@unicamp.br and/or klasouza@gmail.com

ABSTRACT

Aims/hypothesis: Reactive oxygen species (ROS) are involved in many physiological and pathological processes. In the present study, we analyzed whether dexamethasone induces oxidative stress in cultured pancreatic islets and whether the effects of dexamethasone on insulin secretion, gene expression and viability can be counteracted by concomitant incubation with N-acetylcysteine (NAC).

Methods: ROS production was measured by DCFH-DA assay, insulin secretion by RIA, intracellular calcium dynamics by fura-2-based fluorescence, gene expression by Real Time PCR and cell viability by the MTS assay.

Results: Pancreatic islets cultured in the presence of Dexamethasone (Dexa) for 72 h showed increased ROS production. Glucose-stimulated insulin secretion was decreased after Dexa treatment. Intracellular ROS levels were decreased and the insulin secretion capacity was recovered by concomitant treatment with Dexa+NAC. The total insulin content and intracellular Ca^{+2} levels were not modulated in either Dexa or Dexa+NAC groups. There was a decrease in the NAD(P)H production, used as an indicator of viability, after dexamethasone treatment. Concomitant incubation with NAC returned viability to control levels. Dexa also decreased SYT VII gene expression; in contrast, the Dexa+NAC group demonstrated an increased expression of SYT VII compared to controls. Surprisingly, treatment with N-acetylcysteine decreased the gene expression of the antioxidant enzyme Cu/ZnSOD.

Conclusions/interpretation: Our results indicate that dexamethasone increases ROS production, decreases viability and impairs insulin secretion in pancreatic rat islets. These effects can be counteracted by N-acetylcysteine treatment, which not only decreases ROS levels but also modulates genes involved in the secretory pathway and those coding for antioxidant enzymes.

Key words: free radicals, glucocorticoids, insulin secretion, exocytosis, cytotoxic effects, enzymes, signalling pathways, antioxidant therapy, type 2 diabetes mellitus.

Abbreviations: ROS: reactive oxygen species, Dexa: dexamethasone, NAC: n-acetylcysteine, SYT VII: synaptotagmin VII, GPx: glutathione peroxidase, GC: glucocorticoids, VAMP-2: vesicle-associated membrane protein 2, Cu/ZnSOD: copper zinc superoxide dismutase, MnSOD: manganese superoxide dismutase, Cacnb2: calcium channel beta 2 subunit.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP. L.P. Roma was the recipient of a CAPES post-graduated fellowship. We thank Dr. M. C. Marcondes for allowing the use of the facilities of their laboratories, and Dr. N. Conran for English editing.

INTRODUCTION

Increased oxidative stress and free-radical damage have been proposed to be implicated in diabetes development (1). In type 1 diabetes, ROS participate in beta-cell death triggered by the autoimmune reaction, a process that involves the mobilisation of pro-inflammatory mediators, especially cytokines (2). In type 2 diabetes, excessive ROS production impairs insulin secretion, leading to pancreatic islet dysfunction and finally beta cell death (3; 4). On the other hand, ROS play an important physiological role, signalling for appropriate insulin synthesis and secretion in beta cells (5). Pancreatic beta cells are particularly vulnerable to ROS, due to their low antioxidant capacity and especially due to their low capacity to detoxify hydrogen peroxide, as these cells possess very low levels of catalase and glutathione peroxidase (GPx) (3; 6).

The diabetogenic action of glucocorticoids (GC) has been extensively studied (12-15). GC induces insulin resistance (9) and impairs insulin secretion from pancreatic beta cells (10; 11). Additionally, high levels of GC also lead to an increase in hepatic gluconeogenesis (8), which contributes to the diabetic status. GC action on target cells is primarily driven by activation of cytoplasmic GC receptors (GCR). However, despite extensive studies (12-15), the molecular mechanisms involved in GC-induced diabetes are only partially known.

Interestingly, dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes are ROS mediated, and the use of N-acetylcysteine (NAC) (16) decreases cell death. Recently, our group demonstrated that ROS mediate some of the deleterious effects of dexamethasone (a synthetic glucocorticoid) on insulin-producing cells (17). Thus, it is evident that ROS play an important role in GC signalling. In this study, we analyzed whether dexamethasone can induce oxidative stress in cultured pancreatic islets and whether the dexamethasone effects on insulin secretion, gene expression and viability can be counteracted by concomitant incubation with NAC. Using this approach, we found

evidence that dexamethasone increases reactive oxygen species, and that the use of NAC can ameliorate the lower viability and impaired insulin secretion induced by the corticoid. These effects are possibly mediated through changes in gene expression such as the calcium sensor synaptotagmin VII and antioxidant enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Dextrose, NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ and NaHCO₃, were from Mallinckrodt Baker, Inc (Phillipsburg, NJ, USA). Ethanol, methanol, chloroform and isopropyl alcohol, were from Synth (Diadema, SP, Brazil). Trizol reagent and PCR primers were from Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA). All other real-time PCR reagents were from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Dexamethasone, N-acetylcysteine, Hepes, DCFH-DA, albumin, activated charcoal, dextran and all other reagents were from Sigma (St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated.

Islet isolation and dexamethasone incubation. Ninety-days old male Wistar rats were provided by the Animal Breeding Centre of the University of Campinas. All experimental procedures were conformed to The Guiding Principles for the Care and Use of Animals (DHEW Publication, NIH 80-23) and were approved by the Ethics Committee of the University of Campinas (CEEa/IB/UNICAMP, protocol number: 1140-1). For each set of experiments, pancreatic islets were obtained by collagenase digestion of pancreata, isolated by centrifugation over a Ficoll gradient and subsequently hand-collected. After isolation, islets were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 11 mmol/l glucose, 10 % (v/v) foetal calf serum (FCS), penicillin, and streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C and 5 % CO₂. Thereafter cells were exposed for 72 h to 1 µmol/l of dexamethasone (Dexa group) or dexamethasone plus 1 mmol/l of N-acetylcysteine (Dexa+NAC group). Control islets were kept in the absence of the compounds (Control group). The medium was renewed every other day.

Determination of intracellular ROS by DCFH-DA fluorescence. Control and treated islets were washed with Krebs-Hepes buffer. Thereafter islets were placed in black coloured Costar plates and incubated in Krebs-Hepes buffer containing 25 mmol/l of Glucose and 10 μ mol/l of DCFH-DA for 30 min at 37°C. Fluorescence emission was detected at 460/530 nm excitation/emission using a fluorometer (Fusion, PerkinElmer Life Science, MA). Protein concentration was measured by Bradford. The resulting fluorescence was expressed as AUF/ μ g of protein.

Insulin secretion and total insulin measurements. Groups of 5 islets were first incubated for 45 min at 37°C in Krebs-bicarbonate buffer containing 5.6 mmol/l glucose and equilibrated with 95 % O₂ – 5 % CO₂, pH 7.4. The solution was then replaced with 1 ml of fresh Krebs-bicarbonate buffer and the cells were incubated for 1 h with medium containing 2.8 or 25 mmol/l of glucose. The incubation medium contained (mmol/l): 115 NaCl, 5 KCl, 24 NaHCO₃, 2.6 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 0.3 % (w/v) BSA. At the end of the incubation period, aliquots of the medium were collected for insulin determination by radioimmunoassay (RIA) using rat insulin as standard. Samples were normalised by total protein content. For total insulin content, groups of 5 islets were homogenized by sonication (15 s) and centrifuged to remove debris. Supernatants were collected and insulin measured by RIA.

MTS viability assay. In all sets of experiments, the viability of islets was determined after a 4 h incubation period using a microplate-based MTS kinetic assay, following the instructions contained in the manual (CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assays, Promega Corporation, Madison, WI). The results were expressed as area under the curve (AUC) followed by calculation of control percentage. All the results were normalized to total protein content.

[Ca⁺²]_i measurement: After 72 h in culture, groups of cultured control, Dexa- and Dexa plus NAC-treated islets were transferred to plates containing Krebs-bicarbonate buffer with 5.6 mmol/l glucose and 1 % albumin, continuously gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ and incubated for 1 h at 37°C. Thereafter, 5 µmol/l fura2/AM (Invitrogen) was added and the islets incubated for an additional period of 1 h. Islets were then transferred to an thermostatically-regulated open chamber (37°C), placed on the stage of an inverted microscope (Nikon UK, Kingston, UK), and perfused with Krebs-bicarbonate buffer without albumin at a flow rate of 1.5 ml/min. A ratio image was acquired approximately every 5 s with a PTI CCD camera (PCO AG, Kelheim, Germany), equipped with 340 and 380 nm, 10 nm bandpass filters. Data were obtained using the ImageMaster3 software (Photon Technology International, NJ, USA).

Quantitative Real time PCR. Total cellular RNA was extracted from groups of 500 islets using Trizol reagent. The cDNA was obtained from 3 µg of total RNA using the High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. Real time reactions were made using the Fast SYBR Green technology (Applied Biosystems) in a total volume of 15 µl. Samples were first denatured at 94°C for 10 min followed by 30 PCR cycles. Each PCR cycle comprised melting at 95°C for 3 s, and annealing-extension at 60°C for 30 s. PCR amplifications were performed in duplicate. The purity of the amplified PCR products was verified by melting curves. The mRNA expression of selected genes was normalized against the mRNA expression levels of the housekeeping gene, Gapdh. There were no differences in the expressions of Gapdh among all groups, when normalised to the beta-actin gene expression (not shown). A list of primers is provided in supplementary Table S1.

Statistics. All data are expressed as means $\pm$ SE. Statistical analyses for each group were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni (Prism analysis program, Graphpad, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of dexamethasone and NAC on reactive oxygen species (ROS) generation.

Dexamethasone (1 $\mu\text{mol/l}$) exposure for 72 h increased ROS production by 20 % compared to control islets, as measured by dichlorofluorescein (DCFH-DA) oxidation (Fig. 1). Concomitant incubation of pancreatic islets with dexamethasone plus N-acetylcysteine (NAC) suppressed ROS production.

Effects of dexamethasone and NAC on insulin release. At a non-stimulatory concentration of glucose (2.8 mmol/l), there were no differences in insulin release among Dexa, Dexa plus NAC and control groups (Fig. 2A). Using stimulatory concentrations of glucose (25 mmol/l), insulin secretion was significantly lower in the Dexa group, compared to control islets (10.3 ± 0.7 and 4.1 ± 0.5 ng/ml/islet/ μg of protein, respectively). Concomitant incubation of pancreatic islets with dexamethasone plus NAC recovered insulin secretion capacity of pancreatic islets near to control levels at stimulatory conditions (9.0 ± 0.9 ng of insulin/ml/islet/ μg of protein). The total insulin content after 72 h exposure to dexamethasone was not different either in Dexa or Dexa plus NAC (Fig. 2B) compared to control islets. All the values were normalized to total protein content.

Effects of dexamethasone and NAC treatment on pancreatic islet viability. Exposure of pancreatic islets to 1 $\mu\text{mol/l}$ of dexamethasone for 72 h decreased viability by 25 % compared to control cells, as measured by the MTS test (100 ± 2.9 and 85.1 ± 2.1 % for control and Dexa group respectively, $P < 0.05$, $N = 5$) (Fig. 3). Concomitant incubation of pancreatic islets with dexamethasone plus NAC completely recovered pancreatic islets viability to control levels (99.3 ± 4.6 % of control) (Fig.3).

Effects of dexamethasone and NAC on $[Ca^{+2}]_i$ dynamics. $[Ca^{+2}]_i$ measurements were accessed using the fura-2 method. The rise in the cytosolic calcium in response to glucose is shown in Figure 4. No differences were found in glucose-induced calcium changes neither in Dexa nor Dexa plus NAC groups, compared to the control group (Fig.4). The bars represent the frequency of oscillations (A), maximal amplitude (B) and amplitude of oscillations (C).

Effect of dexamethasone and NAC on the expressions of genes involved in oxidative stress and exocytosis. mRNA levels from genes coding for components of both the exocytotic and the calcium sensing machinery were analysed by real time PCR. Dexamethasone significantly decreased the expression of the *Cacnb2* and *SYT VII* genes, compared to controls (Fig. 5A and 5B, respectively). Concomitant incubation of pancreatic islets with dexamethasone plus NAC strongly increased the expression of both genes. Syntaxin 1 expression was increased in Dexa and Dexa plus NAC groups when compared to controls, whereas VAMP-2 gene expression was not modulated. In addition to the genes that might directly act in the exocytotic pathway, we analyzed genes of selected antioxidant enzymes involved in ROS generation/detoxification. Dexa decreased gene expression of catalase without modifying the expression of Cu/ZnSOD, MnSOD and GPx. Similarly, the Dexa plus NAC group had lower catalase expression and no changes in GPx and MnSOD enzymes. However, the Dexa plus NAC group showed lower Cu/ZnSOD gene expression.

DISCUSSION

Glucocorticoids mediate toxicity on targeting cells through complex signal cascades, which affect the gene expression profile and are critical for cell death and survival (19). Dexamethasone is a synthetic diabetogenic glucocorticoid that has been used as a model of Type 2 diabetes (14; 20). We have previously shown that dexamethasone induces oxidative stress in insulin-producing cells (17). Therefore it is conceivable that antioxidant therapy might be beneficial to the treatment of diabetes and of dexamethasone toxicity. To address this question, we analyzed whether the use of N-acetylcysteine could counteract the deleterious effects of dexamethasone on pancreatic islets. Our results provide evidence that dexamethasone signals in pancreatic islets through increases in reactive oxygen species, modulating the expression of genes linked to the insulin exocytosis and to the antioxidant system. The use of NAC improves pancreatic islet function and viability after dexamethasone exposure.

Several studies suggest an inhibitory effect of dexamethasone on insulin release from pancreatic islets *in vitro* (11; 13; 21) (Fig. 2A). The impairment in NAD(P)H reduction rate in dexamethasone-treated islets (Fig. 3) might contribute to this damage, since it indicates an impaired mitochondrial function. This is particularly important for pancreatic islets in view of the fact that beta cells are sensors of metabolic energy changes. The concomitant treatment with Dexa plus NAC is capable of restoring both the glucose stimulated insulin secretion and the NAD(P)H production in pancreatic islets exposed to dexamethasone. This indicates that ROS generated after dexamethasone exposure are involved in the deleterious effects of the corticoid on insulin secretion and cell viability. In fact, our results confirm that dexamethasone increases oxidative stress in pancreatic islets (Fig. 1), in the same fashion as it does in insulin-producing cells (17); furthermore, NAC treatment efficiently suppresses ROS production.

Previous studies indicate that the deleterious effects of GCs reside in distal steps of the secretion process, since the rise in cytoplasmic Ca^{+2} , glucose oxidation and insulin content are not lower in dexamethasone-treated mouse pancreatic islets after a load of glucose (13). Accordingly, whilst dexamethasone decreases insulin secretion at stimulatory conditions (high glucose concentration), no changes in basal insulin secretion, intracellular Ca^{+2} levels and total insulin content after dexamethasone treatment is observed in pancreatic islets (Fig. 4). Therefore the decrease in SYT VII (Fig. 5), an important calcium sensor involved in exocytosis, might be one of the factors responsible for the impairment of insulin secretion after dexamethasone treatment. Several studies corroborate the role of SYT VII as a crucial player in the regulation of insulin secretion. (22; 23). SYT VII-null mutant mice are glucose intolerant and have impaired insulin secretion *in vivo*. On the other hand, islet architecture, insulin content and calcium responses to glucose are preserved in these animals (22; 24). Hence, NAC treatment may ameliorate calcium signalling and insulin exocytosis, at least partly, by increasing the expression of SYT VII (Fig. 5B). Additionally, NAC also increases the beta 2 subunit of the voltage-dependent calcium channel (Cacnb2, Fig. 5A). The Cacnb2 does not take part in the formation of the structure of the calcium pore. Nevertheless, it has an important role on regulating Ca^{+2} voltage dependent channel activity, through association with the α -1 subunits (26; 27). Interestingly, the beta subunits act as a substrate to protein kinase A (PKA) (28), which is important for insulin secretion and is downregulated after dexamethasone treatment in beta cell lines (29). Hence, increased Cacnb2 in RINm5F cells treated concomitantly with NAC plus dexamethasone (Fig. 5A) might be an attempting compensatory mechanism to cope with the defective calcium sensing mechanisms in these cells, since inactivation of the channel may be delayed by Cacnb2 signalling. As a final outcome, NAC is able to recover the insulin secretion capacity of pancreatic islets exposed to dexamethasone.

It is interesting to note that VAMP-2 is not modulated either by Dexa or by Dexa plus NAC (Fig. 5D), indicating that docking granules are probably not affected and are not one of the factors involved in the impaired GSIS after dexamethasone exposure. Therefore, granule/membrane components are possibly intact as well as the insulin synthesis. Conversely, calcium sensing might be impaired in pancreatic islets exposed to corticoids. Since NAC improves insulin secretion in these islets and, at the same time, increases the expression of genes related to calcium signalling, which are impaired by dexamethasone, it is tempting to speculate that the expression of genes involved in exocytosis might be modulated by the redox status in pancreatic islet.

The antioxidant enzymes neutralize the free radicals formed during cell metabolism (30), and a decrease or increase in antioxidant enzymes activity could be responsible for the excessive ROS generation and, therefore, cell damage (31). The Cu/ZnSOD is a cytoplasmatic enzyme implicated in the detoxification of superoxide radicals, leading to H_2O_2 formation (31). Therefore, high SOD activity could lead to an excess of intracellular H_2O_2 when cells do not have the capacity for H_2O_2 metabolism. This is particularly important in the specific case of beta cells, since they express very low levels of catalase and GPx, two main enzymes in charge of neutralising peroxides (32). Hence, the lower expression of Cu/ZnSOD in the Dexa plus NAC treated group (Fig. 5E) may result in a lower H_2O_2 formation and, therefore, lower toxicity to pancreatic islets. Conversely, low catalase expression in the dexamethasone-treated group could be crucial for elevated H_2O_2 and, consequently, for oxidative damage (Fig. 5G).

NAC has been widely used for the treatment of the overdose of paracetamol, and it has recently been administered to treat psychiatric disorders (33; 34) and pulmonary diseases (35). Additionally, NAC improves insulin signalling in muscle and liver of animal models of insulin resistance (36) and improves glucose uptake in dexamethasone-treated insulin-resistance adipocytes (37). Here, we show that NAC ameliorates islets dysfunction caused by the

diabetogenic glucocorticoid dexamethasone. All these effects are, in principle, somewhat dependent on excessive ROS generation (17; 37). Hence, antioxidant therapy using NAC may be an efficient strategy to block the diabetogenic effects of glucocorticoids. The low toxicity of NAC when administered orally is an additional advantage of the drug (34).

In conclusion, our results suggest that dexamethasone increases reactive oxygen species, and decreases both viability and glucose-stimulated insulin secretion in cultured pancreatic rat islets. These effects can be efficiently counteracted after NAC treatment. The NAC action is mediated in part through modulation of genes involved in insulin secretion and antioxidants enzymes. These results may contribute to the better understanding of the role of ROS in the mechanisms of the development of Type 2 Diabetes after exposure to glucocorticoids.

REFERENCES

1. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
2. Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL: Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52:156-165, 2008
3. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M: Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20:463-466, 1996
4. Li N, Frigerio F, Maechler P: The sensitivity of pancreatic beta-cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 36:930-934, 2008
5. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S: Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56:1783-1791, 2007

6. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742, 1997
7. Hoogwerf B, Danese RD: Drug selection and the management of corticosteroid-related diabetes mellitus. *Rheum Dis Clin North Am* 25:489-505, 1999
8. McMahon M, Gerich J, Rizza R: Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev* 4:17-30, 1988
9. Schacke H, Docke WD, Asadullah K: Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96:23-43, 2002
10. Delaunay F, Khan A, Cintra A, Davani B, Ling ZC, Andersson A, Ostenson CG, Gustafsson J, Efendic S, Okret S: Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J Clin Invest* 100:2094-2098, 1997
11. Pierluissi J, Navas FO, Ashcroft SJ: Effect of adrenal steroids on insulin release from cultured rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 29:119-121, 1986
12. Davani B, Portwood N, Bryzgalova G, Reimer MK, Heiden T, Ostenson CG, Okret S, Ahren B, Efendic S, Khan A: Aged transgenic mice with increased glucocorticoid sensitivity in pancreatic beta-cells develop diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1:S51-59, 2004
13. Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC: Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest* 99:414-423, 1997
14. Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR: Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol* 85:536-545, 2007
15. Ranta F, Avram D, Berchtold S, Dufer M, Drews G, Lang F, Ullrich S: Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. *Diabetes* 55:1380-1390, 2006
16. Tonomura N, McLaughlin K, Grimm L, Goldsby RA, Osborne BA: Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity. *J Immunol* 170:2469-2478, 2003

17. Roma PL, Bosqueiro JR, Cunha DA, Carneiro EM, Gurgul-Convey E, Lenzen S, Boschero AC, Souza KL: Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression. *Free Radic Biol Med* Submitted, 2009
18. Wendel A: Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333, 1981
19. Sun Y, Tao YG, Kagan BL, He Y, Jr SS: Modulation of transcription parameters in glucocorticoid receptor-mediated repression. *Mol Cell Endocrinol* 295:59-69, 2008
20. Lenzen S, Bailey CJ: Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. *Endocr Rev* 5:411-434, 1984
21. Barseghian G, Levine R: Effect of corticosterone on insulin and glucagon secretion by the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* 106:547-552, 1980
22. Gauthier BR, Wollheim CB: Synaptotagmins bind calcium to release insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1279-1286, 2008
23. Gao Z, Reavey-Cantwell J, Young RA, Jegier P, Wolf BA: Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca^{2+} -induced insulin secretion in pancreatic islet β -cells. *J Biol Chem* 275:36079-36085, 2000
24. Li Y, Wang P, Xu J, Gorelick F, Yamazaki H, Andrews N, Desir GV: Regulation of insulin secretion and GLUT4 trafficking by the calcium sensor synaptotagmin VII. *Biochem Biophys Res Commun* 362:658-664, 2007
25. Cunha DA, Roma LP, Boschero AC: Prolactin modulates the association and phosphorylation of SNARE and kinesin/MAP-2 proteins in neonatal pancreatic rat islets. *Mol Cell Endocrinol* 273:32-41, 2007
26. Yang SN, Berggren PO: β -cell Ca_v channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E16-28, 2005
27. Eliasson L, Abdulkader F, Braun M, Galvanovskis J, Hoppa MB, Rorsman P: Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* 586:3313-3324, 2008
28. Rousset M, Cens T, Charney P: Alone at last! New functions for Ca^{2+} channel β subunits? *Sci STKE* 2005:pe11, 2005

29. Liu HK, Green BD, McClenaghan NH, McCluskey JT, Flatt PR: Deleterious effects of supplementation with dehydroepiandrosterone sulphate or dexamethasone on rat insulin-secreting cells under in vitro culture condition. *Biosci Rep* 26:31-38, 2006
30. Halliwell B: Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401:1-11, 2007
31. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84, 2007
32. Lenzen S: Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36:343-347, 2008
33. Berk M, Ng F, Dean O, Dodd S, Bush AI: Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends Pharmacol Sci* 29:346-351, 2008
34. Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M: N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther* 8:1955-1962, 2008
35. Sadowska AM, Verbraecken J, Darquennes K, De Backer WA: Role of N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 1:425-434, 2006
36. Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Mathe V, Mikogami T, Tome D, Huneau JF: Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance. *Free Radic Biol Med* 42:1089-1097, 2007
37. Houstis N, Rosen ED, Lander ES: Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944-948, 2006

Figure legends

Figure 1: Total ROS production was measured by dichlorofluorescein (DCFH-DA) oxidation. Control, Dexa and Dexa+NAC islets were incubated for 72 h with or without 1 $\mu\text{mol/l}$ dexamethasone (Dexa group) or Dexa plus NAC1mm/l (Dexa+NAC group) and assayed in the presence of 25 mmol/l glucose. N =6. * $P < 0.05$, compared to control; Anova followed by Dunnet.

Figure 2: A) Effects of Dexa and NAC treatment on insulin secretion. Islets were treated with 1 $\mu\text{mol/l}$ of dexamethasone (Dexa) for 72 h in the presence or absence of 1 mmol/l of NAC (Dexa+NAC). After the culture period, groups of five islets were pre-incubated in Krebs-bicarbonate buffer containing 5.6 mmol/l of glucose and then incubated with 2.8 mmol/l of glucose (2.8) or 25 mmol/l glucose (25). After 1 hour incubation, supernatants were collected and insulin was measured by RIA. N=20-30. * $P < 0.05$; Anova followed by Bonferroni. **B)** Effect of Dexa and NAC on total insulin content in cultured rat islets. After 72 h of culture, groups of 5 islets were homogenized and the total insulin content was measured by RIA (N=18).

Figure 3: Effects of Dexa and NAC treatment on cell viability. Islets were treated with 1 $\mu\text{mol/l}$ of dexamethasone for 72 h in the presence or absence of 1 mmol/l of NAC. Viability was accessed using the MTS method. N=5. * $P < 0.05$; Anova followed by Bonferroni.

Figure 4: Glucose-induced $[Ca^{+2}]_i$ changes in pancreatic islets after 72 h of dexamethasone and Dexa plus NAC treatment. Bars represent mean values of 5 independent experiments.

Figure 5: Effects of Dexa and Dexa+NAC on the gene expression of **A)** Cacb2, **B)** Synaptotagmin VII, **C)** Syntaxin 1, **D)** VAMP-2, **E)** Cu/ZnSOD, **F)** MnSOD, **G)** Catalase and **H)** GPx. After reverse transcription, real time analyses were performed using Gapdh as housekeeping gene. The experiments were performed after 72 h of culture. N= 6-8 independent experiments. * $P < 0.05$, ANOVA followed by Bonferroni.

Figure 1- DCFH-DA

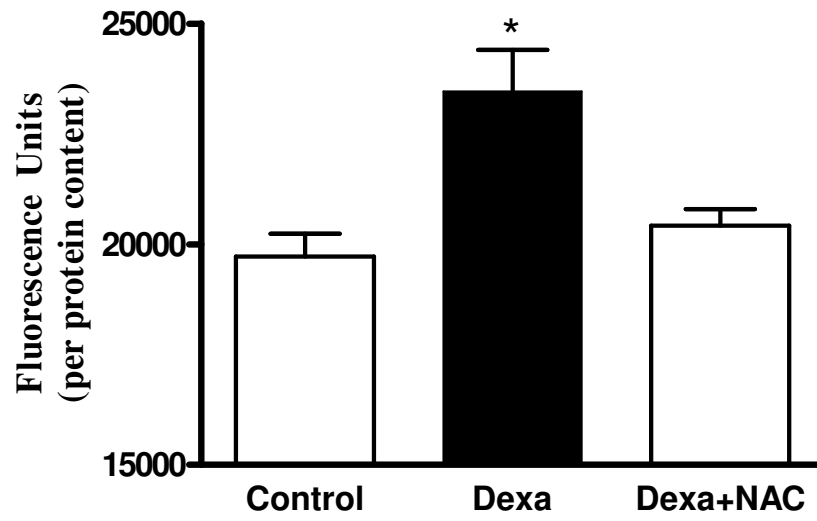
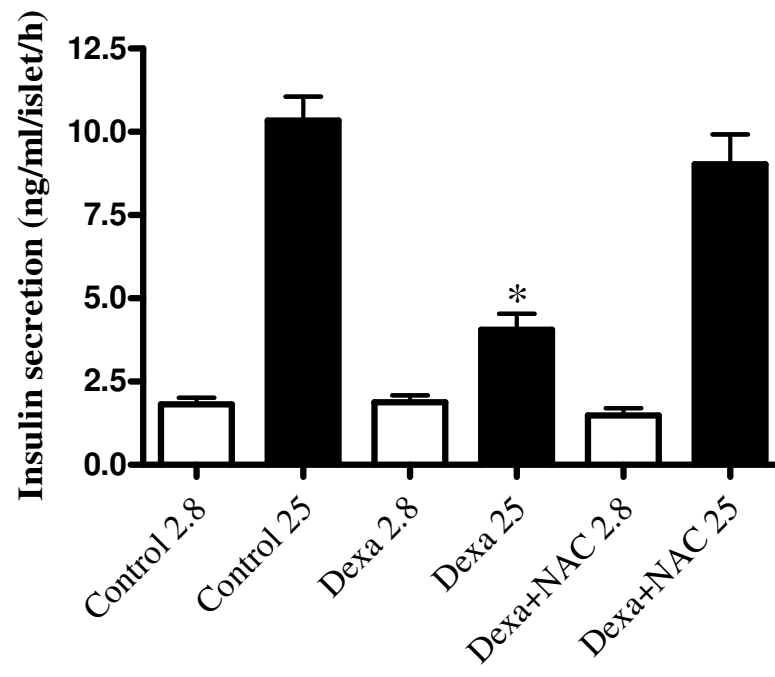


Figure 2- insulin secretion and Insulin content

A)



B)

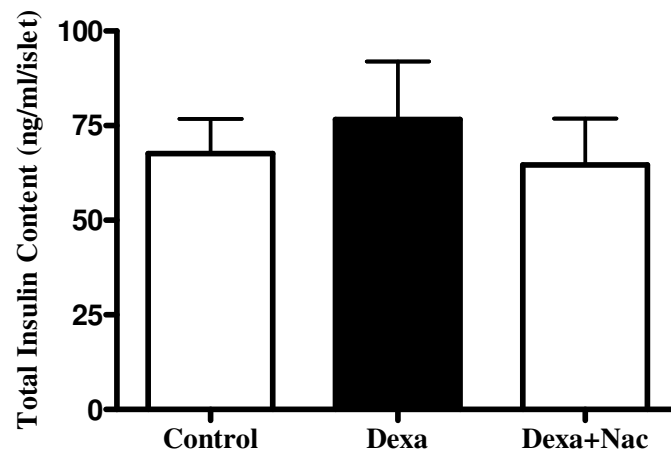


Figure 3 – MTS

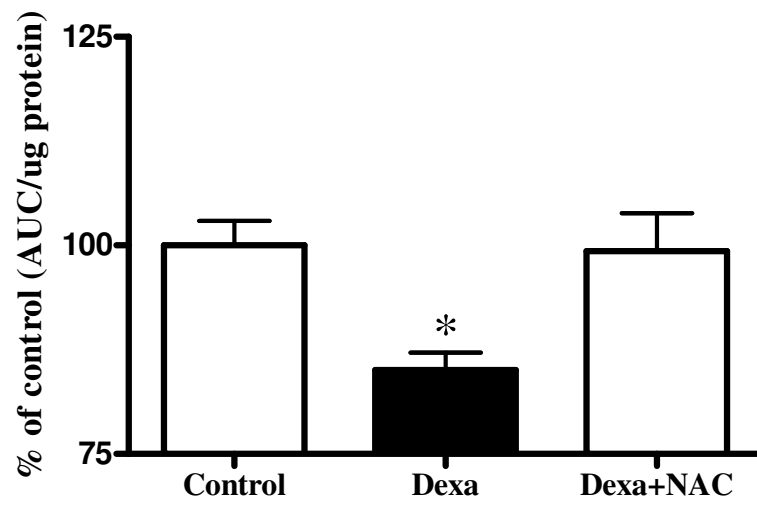


Figure 4- Calcium dynamics

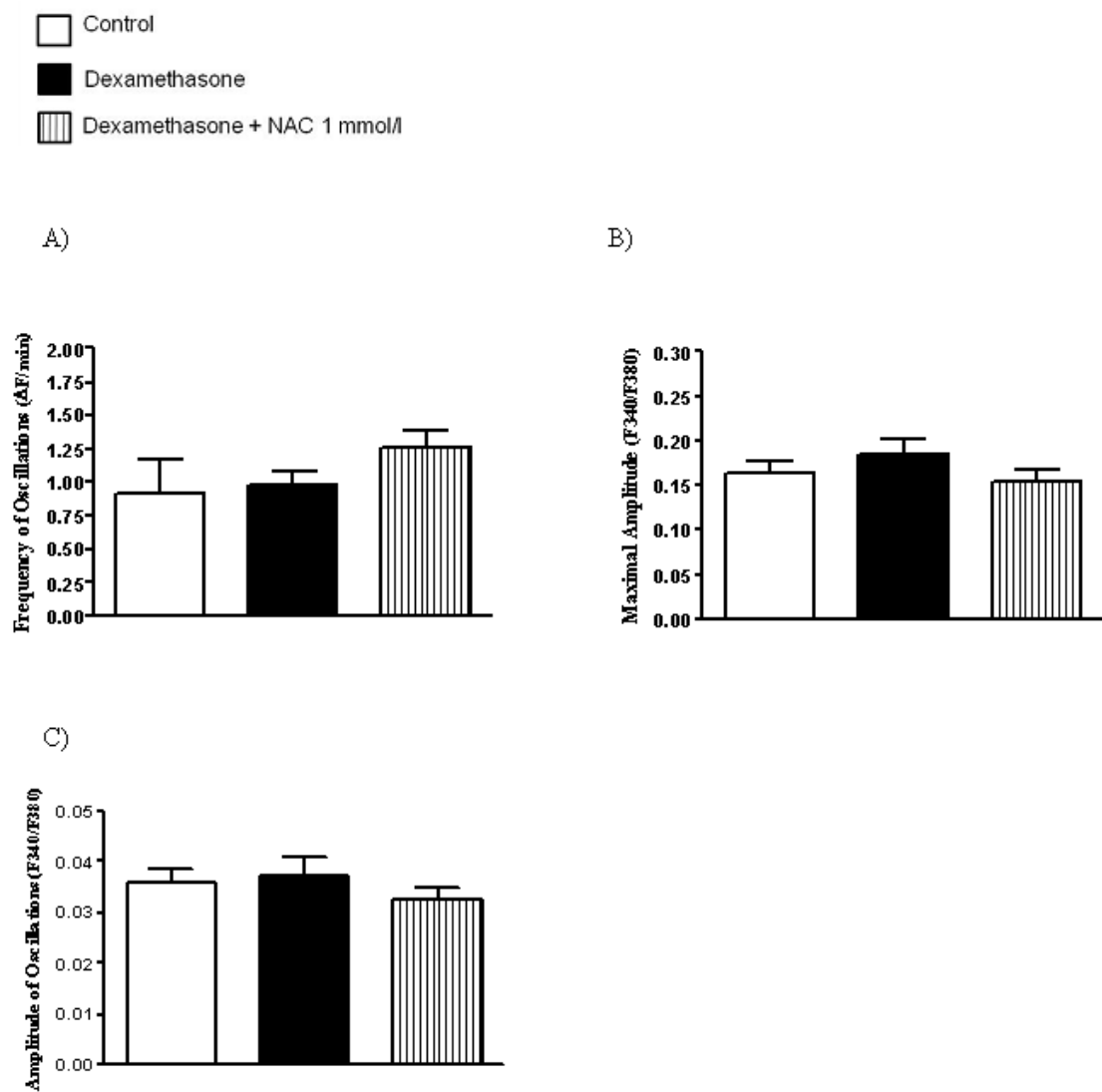
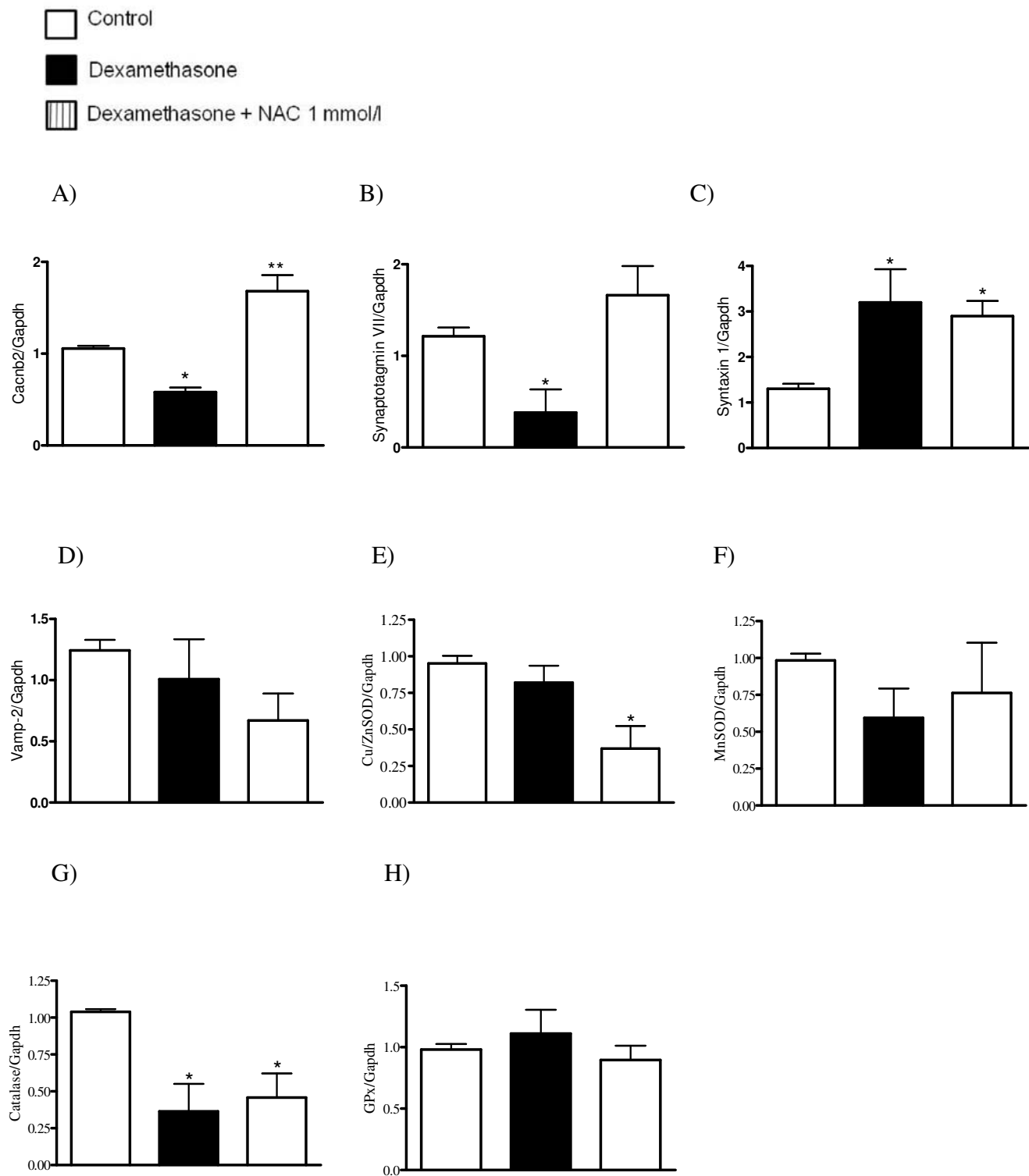


Figure 5 – Real Time PCR



Supplementary Table S1. Q-PCR primers

Gene	GenBank Access	Sequence
beta-Actin	NM_031144	Fw: GCATGTGCAAGGCCGGCT Rv: CACCATCACACCCTGGTGCCTA
Catalase	NM_012520	Fw: GATGAAGCAGTGGAAGGAGC Rv: TGCCATCTCGTCGGTGAAA
Cacnb2	NM_053851	Fw: TGCCCCCTGAAGAGAGAAA Rv: CTGAGGATGAACAAGAGGAG
Cu/ZnSOD	NM_017050	Fw: TGAAGAGAGGCATGTTGGAGA Rv: TCATCTTGTTTCTCGTGGACC
GAPDH	NM_017008	Fw: TCACCACCATGGAGAAGGC Rv: GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA
Glutathione peroxidase	NM_030826	Fw: CCCTCAAGTATGTCCGACCC Rv: GCAGGAAGGTAAAGAGCGGG
MnSOD	NM_017051	Fw: CCTCCCTGACCTGCCTTACGACTA Rv: TTCAGATTGTTACGTAGGTCGCG
Synaptotagmin 7	NM_021659	Fw: AGACCAAGGTGAAACGGAAGA Rv: CTGAGCTTGTCTTTGTCCATG
Syntaxin 1	NM_053788	Fw: ATGAAGGACCGAACCCAGGAGGC Rv: TCTATCCCAAAGATGCCCCCGA
VAMP-2	NM_012663	Fw: GCATCTCTCCTACCCTTTCA Rv: TTTAGGGGTCTGAGGGTACA

V – Discussão

5.0 DISCUSSÃO

A dexametasona é um glicocorticóide sintético usado primariamente na redução do processo inflamatório e também na terapia imunossupressora. Uma vez que evidências têm associado o diabetes mellitus do tipo II (T2DM) a processos inflamatórios (revisão em Rizzo e Fiorucci, 2006) seria lógico supor um efeito benéfico da dexametasona para o tratamento dessa doença. Os glicocorticóides têm ação pleiotrópica no organismo e a secreção dos mesmos é essencial para a manutenção da homeostase e para a preparação do organismo para responder ao estresse. Por outro lado, mudanças súbitas na concentração de glicocorticóides plasmáticos, mantidas por períodos prolongados, têm sido associadas a diversas doenças, inclusive o T2DM (revisão em Buckingham, 2006). O efeito da dexametasona em relação ao diabetes é dúbio principalmente devido ao fato de alguns trabalhos mostrarem um efeito benéfico da droga em condições experimentais de pancreatite (Kandil, Lin *et al.*, 2006) e aumento de células betas *in vivo* (Choi, Jang *et al.*, 2006). Ocorre também um aumento na secreção de insulina em resposta a variações nos níveis de glicose (Rafacho, Roma *et al.*, 2007), um efeito que pode ser atribuído à adaptação das células beta a uma maior demanda por insulina (Karlsson, Ostlund *et al.*, 2001). Esse aumento da secreção de insulina é acompanhado por hipertrofia da ilhota, aumento de proteínas do ciclo celular (ciclina, IRS2) (Rafacho, Ribeiro *et al.*, 2008) bem como proteínas de sinalização intra e intercelular como a conexina 36 (Rafacho, Roma *et al.*, 2007). Somado a isso, há também evidências de que a dexametasona poderia contrabalançar os efeitos deletérios da interleucina 1beta em ilhotas e linhagens de célula beta (Corbett, Wang *et al.*, 1993). Por outro lado, a dexametasona induz sinais característicos do desenvolvimento do T2DM em pâncreas de camundongos transgênicos para o polipeptídeo amilóide pancreático (Couce, O'brien *et al.*, 1996) e é evidente a diminuição da secreção de insulina estimulada por diversos secretagogos em ilhotas íntegras incubadas com dexametasona (Gremlich, Roduit *et al.*, 1997; Lambillotte, Gilon

et al., 1997). Outros estudos mostram que elevados níveis de glicocorticóides nos estágios finais da gravidez e pós-parto são responsáveis pelas taxas aumentadas de apoptose e retorno da massa de célula beta em ilhotas pancreáticas de ratas prenhes (Weinhaus, Bhagroo *et al.*, 2000). Os GC reduzem a expressão e fosforilação de proteínas como SERCA2 e STAT3, aumentada durante a prenhez (Anhe, Nogueira *et al.*, 2007). Os mecanismos pelos quais a dexametasona altera a secreção e interfere na viabilidade das células beta não estão bem esclarecidos. Estudos em outros tipos de tecido como músculo e adipócitos (Houstis, Rosen *et al.*, 2006) mostram que a dexametasona aumenta a formação de EROs, sendo um dos mecanismos pelos quais a dexametasona altera a função das células-alvo. Dessa forma, este estudo teve como principal objetivo analisar os mecanismos moleculares da ação citotóxica da dexametasona em linhagens de célula beta e ilhotas pancreáticas.

Primeiramente, analisamos o estado redox geral das células usando DCFH-DA. Células RINm5F expostas a dexametasona tem um aumento do estresse oxidativo tanto em ensaios realizados com 2,8 mmol/l de glicose como com 16 mmol/l (Fig. 2A, artigo 1). Isso mostra que o efeito observado é devido primariamente à exposição à dexametasona sem que alterações no metabolismo celular contribuam majoritariamente para o aumento do estresse oxidativo. As células que superexpressam a catalase possuem níveis baixos de fluorescência, indicando baixa produção de espécies reativas mesmo após o tratamento com dexametasona. Não foi observado um aumento do estresse nitrosativo (produção de NO) em células tratadas com dexametasona (Fig. 2B, artigo 1), da mesma forma que não identificamos a expressão da enzima induzível iNOS (resultados não mostrados). Dados da literatura mostram que o estresse nitrosativo está relacionado com o desenvolvimento do diabetes tipo I onde há o envolvimento de citocinas inflamatórias com conseqüente formação de NO e ativação de vias de morte celular (Souza, Gurgul-Convey *et al.*, 2008). Nossos resultados apontam que outras vias, independentes da

produção de NO, são responsáveis pelas alterações induzidas pela dexametasona. Corroborando nossos resultados, já foi observado aumento de estresse oxidativo induzido pela dexametasona sem concomitante elevação das concentrações de NO em outros tecidos, inclusive com diminuição da formação de NO em endotélio vascular (Mitsui, Azuma *et al.*, 2002).

A seguir, analisamos as atividades de enzimas envolvidas na remoção de espécies reativas de oxigênio, tanto do citoplasma quanto da mitocôndria. A expressão e atividade de enzimas como catalase e glutathione peroxidase em células RINm5F são menores que 5% dos níveis encontrados no fígado (Tiedge, Lortz *et al.*, 1997). Da mesma forma, os níveis dessas enzimas encontrados em ilhotas pancreáticas são muito baixos (Lenzen, Drinkgern *et al.*, 1996). Assim, a pequena redução na atividade da catalase nas células RINm5F.Cat parece não ser o principal efeito tóxico da dexametasona em vista dos níveis muito baixos dessas enzimas nas condições controle. Embora em células essa redução não seja determinante, os efeitos da dexametasona sobre a catalase podem ser mais pronunciados em outros tecidos no qual a atividade dessa enzima tem um importante papel na degradação de H_2O_2 . Em células RINm5F, o tratamento com dexametasona aumenta significativamente a expressão e atividade da enzima Cu/ZnSOD presente no citoplasma, que aumenta a capacidade de geração de H_2O_2 a partir de radicais $O_2^{\cdot -}$. Esse efeito parece ser de crucial importância para os efeitos deletérios da dexametasona, em vista da baixa capacidade que as células produtoras de insulina e ilhotas pancreáticas possuem em degradar o H_2O_2 formado em excesso, sendo incapazes de impedir a posterior formação do radical hidroxil (OH $\cdot$), muito tóxico para as células (Lenzen, 2008).

A superexpressão das enzimas antioxidativas superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase (Lortz, Tiedge *et al.*, 2000; Azevedo-Martins, Lortz *et al.*, 2003; Gurgul, Lortz *et al.*, 2004) conferem sinergicamente proteção contra os efeitos tóxicos do NO, EROs e citocinas em células produtoras de insulina. A geração pelo NO e EROs de peroxinitritos altamente tóxicos e

de outros radicais nitrosados, corroboram a importância dessas enzimas em suprimir a toxicidade celular (Beckman e Koppenol, 1996; Lortz, Tiedge *et al.*, 2000). Posteriormente, a superexpressão MnSOD foi eficiente em proteger células em cultivo expostas a citocinas ou a macrófagos ativados (Hohmeier, Thigpen *et al.*, 1998). A localização celular das enzimas antioxidantes é um fator de suma importância, sendo que já foi demonstrado que a superexpressão de MnSOD (localizada na mitocôndria) é mais eficiente em proteger as células beta contra citocinas em comparação com a superexpressão de Cu/ZnSOD (localizada no citosol) (Gurgul, Lortz *et al.*, 2004). Em nossos resultados sugerimos que a formação de espécies reativas induzidas por dexametasona ocorre primariamente no citosol, sendo o H_2O_2 o principal efector.

Analizamos então se o estresse oxidativo induzido por dexametasona levaria em última análise a morte celular. Como podemos observar na Fig. 4A e 4B (artigo 1), células tratadas com dexametasona tem um aumento na ativação/clivagem de caspase-3, que é uma das caspases efectoras que determinam se a células entrará em apoptose. Por outro lado, células que superexpressam a enzima catalase são resistentes à ação da dexametasona, não tendo alteração na atividade/clivagem da caspase-3.

Para comprovar a indução de apoptose pela dexametasona e também o efeito protetor da superexpressão da catalase, fizemos citometria de fluxo usando anexinaV-FITC como marcador de apoptose e iodeto de propídio como marcador de necrose. As células RINm5F tratadas com dexametasona tem aumento na taxa de apoptose (células marcadas com anexinaV) de cerca de 5 vezes comparadas com células cultivadas na ausência da droga. Por outro lado, células RINm5F.Cat não têm um aumento significativo na taxa de apoptose. Os resultados em linhagens de células, juntamente com os dados em ilhotas pancreáticas, confirmam que a dexametasona na concentração e tempo estudados induzem morte celular por apoptose. Essa morte celular é revertida quando aumentamos a capacidade antioxidante das células através da superexpressão da

catalase. A dosagem de LDH juntamente com a citometria, nos mostra que a morte induzida por dexametasona é exclusivamente por apoptose, não ocorrendo necrose (Fig. 4C, artigo 1). Esses dados são extremamente interessantes, pois outros fármacos diabetogênicos como a aloxana e streptozotocina, induzem morte celular caracterizada por necrose. Por outro lado, hormônios tireoidianos induzem apoptose em células produtoras de insulina. Diversos trabalhos mostram que o aumento na produção de espécies reativas está intimamente ligada a maior morte celular em ilhotas e células beta (Lenzen, 2008; Xu, Long *et al.*, 2008).

Ensaio funcionais com ilhotas pancreáticas

A dexametasona, *in vitro*, diminui a secreção de insulina induzida por glicose em ilhotas e células, embora a diminuição do conteúdo total de insulina seja controversa (Lambillotte, Gilon *et al.*, 1997). Essa diminuição da secreção é associada à diminuição da atividade da PKC e/ou PKA (Toriumi e Imai, 2003; Liu, Green *et al.*, 2006; Zawalich, Tesz *et al.*, 2006) e particularmente à dose e tempo de exposição ao fármaco (Jeong, Oh *et al.*, 2001). Utilizando-se a linhagem MIN6 (uma linhagem de células beta que responde satisfatoriamente a glicose) (Shao, Qiao *et al.*, 2004) observaram-se os mesmos efeitos inibitórios vistos em linhagens de células de rato BRIN-BD11 (Liu, Green *et al.*, 2006) e INS1 (Ranta, Avram *et al.*, 2006). Esta menor secreção de insulina nas células MIN6 pode ser atribuída à diminuição da atividade da glicocinase e aumento da atividade de fosfodiesterasases (que diminuem cAMP) em altas concentrações de glicose. Interessantemente, em concentrações menores de glicose há evidências que a dexametasona também diminui a atividade da glicocinase (Fernandez-Mejia e Davidson, 1992). Esses resultados, adicionados ao fato de que a dexametasona induz apoptose em ilhotas (Weinhaus, Bhagroo *et al.*, 2000) e linhagens de células beta, (Figs. 4 e 5, artigo 1) com clara

diminuição do número de células (Liu, Green *et al.*, 2006; Ranta, Avram *et al.*, 2006) vêm a confirmar que a dexametasona é citotóxica para células beta tanto *in vivo* como *in vitro*.

A sinalização por espécies reativas de oxigênio é importante para a manutenção da homeostase celular, em particular no caso das células beta pancreáticas, nas quais o metabolismo oxidativo é o principal sinal para a secreção de insulina (Lenzen, 2008).

Como as células RINm5F possuem pequena capacidade de secretar insulina em resposta a glicose (pela falta de expressão adequada de glicocinase e do transportador de glicose GLUT2) (Tiedge, Hohne *et al.*, 1993; Tiedge, Elsner *et al.*, 2000), analisamos os efeitos da dexametasona sobre a na presença e ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC, 1 mmol/l).

Ilhotas de ratos por cultivadas por 72 h com dexametasona, apresentam aumento de estresse oxidativo e diminuição de viabilidade, sendo que ambos os parâmetros retornam aos níveis controle quando tratadas concomitantemente com antioxidante NAC (Fig. 1 e 3, artigo 2, respectivamente). Interessantemente, essas alterações são acompanhadas de menor expressão da Cu/ZnSOD no grupo Dexa+NAC (Fig. 5E, artigo 2). A NAC é fonte de precursores da molécula cisteína para a enzima glutamato cisteína ligase, que sintetiza a GSH. A GSH por sua vez pode ter diversas ações, sendo as principais: 1) Substrato de enzimas antioxidantes como GPx, 2) Efeitos antioxidantes diretos, através da ação sobre radicais derivados de tocoferóis ou ascorbato, ajudando a restaurar a ação de diversos antioxidantes intracelulares (vitamina C, vitamina E), e 3) Ações diretas sobre radicais $\text{OH}^\cdot$ e $^1\text{O}_2$ (Valko, Leibfritz *et al.*, 2007). Os efeitos de NAC sobre a expressão da Cu/ZnSOD já haviam sido mostrados em miocárdio de ratos diabéticos, onde o tratamento com o antioxidante atenua a disfunção mitocondrial através da redução da enzima Cu/ZnSOD, sem ocorrer modificações na expressão da GSH (Xia, Guo *et al.*, 2006).

Ao analisarmos a secreção de insulina estimulada por glicose, encontramos redução da secreção em condições estimulatórias (25 mmol/l de glicose) no grupo tratado com dexametasona (Fig. 2A, artigo 2). Essa menor secreção não é acompanhada por redução no conteúdo total (Fig. 2B, artigo 2), o que demonstra que em ilhotas cultivadas, a dexametasona tem efeitos na via de sinalização para a secreção de insulina. A utilização de NAC durante o período de tratamento com dexametasona restaura a secreção de insulina estimulada por glicose a níveis próximos das ilhotas controles, mostrando que a produção de EROs deve interferir em etapas cruciais do processo secretório.

A maioria dos estudos que relacionam estresse oxidativo e menor secreção de insulina baseiam-se principalmente nos efeitos apoptóticos e redução do conteúdo de insulina induzido pelo aumento de EROs. De fato, elevações nas concentrações de EROs leva à indução de vias de morte celular, caracterizada principalmente por apoptose, com ativação de caspases e fragmentação do DNA (Marchetti, Del Guerra *et al.*, 2004). Read *et al* (Read, Masson *et al.*, 1997) mostraram que o aumento no estresse oxidativo diminui a ligação do RIPE3b1-like factor (MafA) ao promotor, reduzindo sua atividade e levando, conseqüentemente, a diminuição da síntese de insulina. Outros estudos mostram a menor expressão protéica de PDX-1 resultando na redução da ligação desse fator de transcrição ao promotor do gene da insulina (Tanaka, Tran *et al.*, 2002). Situações opostas, ou seja, baixa sinalização oxidativa, também possui efeitos deletérios para a célula beta. A superexpressão de enzimas como catalase e MnSOD em camundongos diabéticos não obesos (do inglês: NOD - Nonobese diabetic) acelera o desenvolvimento do diabetes, com concomitante aumento da apoptose e diminuição de PDX-1 (Li, Chen *et al.*, 2006).

A ação de EROs é observada em ilhotas tratadas com mercúrio, onde o aumento do estresse oxidativo leva a alteração das vias PI3K (fosfatidil inositol cinase 3) e AKT (ou PKB,

proteína cinase B) levando a disfunção da célula beta pancreática (Chen, Huang *et al.*, 2006). Esses efeitos também foram vistos em células vasculares do músculo liso (Ushio-Fukai, Alexander *et al.*, 1999). A expressão do transportador de glicose GLUT4, fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) e ativação da AKT no músculo também é diminuída concomitantemente com a elevação na produção de EROs, levando a resistência a insulina (Lastra, Whaley-Connell *et al.*, 2008). Dessa forma, as espécies reativas podem interferir diretamente sobre a ação e atividade de proteínas, levando a menor sinalização e menor ação da insulina. As proteínas possuem numerosos sítios ativos sendo alvos importante do ataque de EROs. Além disso, proteínas ligadas a metais, tornam-se especialmente mais susceptíveis a reações de oxido-redução (Valko, Morris *et al.*, 2005). Entre os danos finais estão alterações de atividades enzimáticas, mudança da estrutura terciária, degradação, fragmentação, e funções celulares alteradas. Os danos sobre o DNA incluem alteração da ligação de fatores de transcrição bem como mudanças que levam a mutações ou alterações na transcrição de determinados genes (Valko, Rhodes *et al.*, 2006).

Como observamos que a utilização de antioxidantes melhora a secreção de insulina, analisamos a expressão gênica de proteínas envolvidas na extrusão dos grânulos de insulina e sinalização de cálcio intracelular. Como proposto por Lambillotte *et al.* (Lambillotte, Gilon *et al.*, 1997), a dexametasona tem seus efeitos em etapas tardias da secreção, já que a oxidação de glicose, conteúdo total de insulina e influxo de cálcio não são menores nas ilhotas de camundongo cultivadas com o glicocorticóide (ocorrem apenas algumas alterações na dinâmica dos movimentos de cálcio). Semelhantemente, não observamos diferenças nas variações intracelulares de cálcio, tanto nos grupos cultivados com dexametasona, quanto no grupo Dexa+NAC quando comparados ao controle (Fig. 4, artigo 2). Analisamos então a expressão gênica de proteínas que compõem a maquinaria secretória como a Syntaxina 1, VAMP-2 e o

sensor de cálcio Sinaptotagmina VII. Nossos resultados mostram que a dexametasona interfere na sinalização do cálcio intracelular através da diminuição da expressão da Sinaptotagmina VII (Fig. 5B, artigo 2). Estudos anteriores, mostram que a dexametasona tem efeitos sobre a sinalização do cálcio intracelular, com redução da PKC, enzima ativada por cálcio (Lambillotte, Gilon *et al.*, 1997; Zawalich, Tesz *et al.*, 2006). No nosso estudo, demonstramos ainda que essa ação é mediada através da formação de espécies reativas, pois a adição de NAC aumenta a expressão gênica da Sinaptotagmina VII, o que pode ser responsável pela maior secreção de insulina nesse grupo. O papel da Sinaptotagmina VII no processo exocitótico é demonstrado tanto em experimentos *in vivo* como *in vitro* (Gauthier, Duhamel *et al.*, 2008). Em estudos em linhagens de células INS1E, a Sinaptotagmina VII é indispensável para a secreção de insulina estimulada por glicose. Além disso, camundongos *knockout* para a Sinaptotagmina VII possuem intolerância a glicose, além de menor secreção de insulina. Entretanto, as ilhotas pancreáticas apresentam estrutura normal, sem alterações no conteúdo total de insulina e dinâmica do cálcio em resposta à glicose. Esses dados demonstram que os efeitos da Sinaptotagmina VII são exclusivamente sobre a sinalização do cálcio e interfere nas etapas da exocitose (Gauthier e Wollheim, 2008)

Estratégias para proteger a célula beta contra esses efeitos citotóxicos podem ser de grande valia para direcionar melhor a terapêutica contra o diabetes. Essa terapêutica poderia incluir drogas que aumentem a resistência das células contra o estresse oxidativo, em particular, como mostra nossos resultados, com drogas que aumentem a capacidade peroxidativa das células, como o aumento na expressão/atividade da catalase. É importante lembrar que a formação das espécies reativas de oxigênio faz parte do processo metabólico celular e que essa formação é necessária para sinalizar diversos eventos dentro das células. Nossos resultados indicam que a produção excessiva de EROS induzida por dexametasona é prejudicial à célula beta pancreática levando a apoptose e menor secreção de insulina.

VI – Conclusões

6.0 – CONCLUSÕES

- A melhora do status de defesa antioxidante em células produtoras de insulina através da superexpressão da catalase, e em ilhotas pancreáticas através do uso de N-acetilcisteína, confere resistência contra a citotoxicidade causada pela dexametasona.
- A formação de espécies reativas de oxigênio é um dos mecanismos pelo qual os glicocorticóides induzem apoptose em linhagens de célula beta e reduzem a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.
- Os níveis aumentados da expressão e atividade da Cu/ZnSOD pode favorecer o aumento na produção das espécies reativas em células RINm5F.
- O aumento da formação de espécies reativas leva à modulação de genes envolvidos na exocitose e de enzimas antioxidativas em ilhotas pancreáticas.
- Estratégias que melhorem a capacidade antioxidante, em especial da capacidade peroxidativa da célula beta, podem ser de grande valia para direcionar melhor a terapêutica contra o diabetes induzido por glicocorticóides.

VII – Bibliografia

7.0 Bibliografia

Amsterdam, A. e R. Sasson. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. Mol Cell Endocrinol, v.189, n.1-2, Mar 28, p.1-9. 2002.

Anhe, G. F., T. C. Nogueira, *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period. J Endocrinol, v.195, n.1, Oct, p.17-27. 2007.

Azevedo-Martins, A. K., S. Lortz, *et al.* Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation in insulin-producing cells. Diabetes, v.52, n.1, Jan, p.93-101. 2003.

Baraniuk, J. N. Molecular actions of glucocorticoids: an introduction. J Allergy Clin Immunol, v.97, n.1 Pt 2, Jan, p.141-2. 1996.

Barseghian, G. e R. Levine. Effect of corticosterone on insulin and glucagon secretion by the isolated perfused rat pancreas. Endocrinology, v.106, n.2, Feb, p.547-52. 1980.

Bashan, N., J. Kovsan, *et al.* Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. Physiol Rev, v.89, n.1, Jan, p.27-71. 2009.

Beckman, J. S. e W. H. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol, v.271, n.5 Pt 1, Nov, p.C1424-37. 1996.

Berk, M., F. Ng, *et al.* Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. Trends Pharmacol Sci, v.29, n.7, Jul, p.346-51. 2008.

Blair, A. S., E. Hajdich, *et al.* Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38

mitogen-activated protein kinase signaling pathways. J Biol Chem, v.274, n.51, Dec 17, p.36293-9. 1999.

Bloom, J. W., J. Chacko, *et al.* Differential control of eosinophil survival by glucocorticoids. Apoptosis, v.9, n.1, Jan, p.97-104. 2004.

Blouet, C., F. Mariotti, *et al.* Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance. Free Radic Biol Med, v.42, n.7, Apr 1, p.1089-97. 2007.

Boschero, A. C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células B-pancreáticas. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v.40, n.3, p.149-155. 1996.

Boschero, A. C., L. F. Stoppiglia, *et al.* Expression of a thioredoxin peroxidase in insulin-producing cells. Diabetes Metab, v.28, n.6 Pt 2, Dec, p.3S25-8; discussion 3S108-12. 2002.

Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes, v.54, n.6, Jun, p.1615-25. 2005.

Buckingham, J. C. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. Br J Pharmacol, v.147 Suppl 1, Jan, p.S258-68. 2006.

Buttgereit, F., M. Wehling, *et al.* A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. Arthritis Rheum, v.41, n.5, May, p.761-7. 1998.

Chen, Y. W., C. F. Huang, *et al.* The role of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling in low-dose mercury-induced mouse pancreatic beta-cell dysfunction in vitro and in vivo. Diabetes, v.55, n.6, Jun, p.1614-24. 2006.

Choi, S. B., J. S. Jang, *et al.* Exercise and dexamethasone oppositely modulate beta-cell function and survival via independent pathways in 90% pancreatectomized rats. J Endocrinol, v.190, n.2, Aug, p.471-82. 2006.

Corbett, J. A., J. L. Wang, *et al.* Nitric oxide mediates IL-1 beta-induced islet dysfunction and destruction: prevention by dexamethasone. Autoimmunity, v.15, n.2, p.145-53. 1993.

Couce, M., T. D. O'Brien, *et al.* Diabetes mellitus in cystic fibrosis is characterized by islet amyloidosis. J Clin Endocrinol Metab, v.81, n.3, Mar, p.1267-72. 1996.

Cunha, D. A., L. P. Roma, *et al.* Prolactin modulates the association and phosphorylation of SNARE and kinesin/MAP-2 proteins in neonatal pancreatic rat islets. Mol Cell Endocrinol, v.273, n.1-2, Jul 15, p.32-41. 2007.

Davani, B., N. Portwood, *et al.* Aged transgenic mice with increased glucocorticoid sensitivity in pancreatic beta-cells develop diabetes. Diabetes, v.53 Suppl 1, Feb, p.S51-9. 2004.

Del Prato, S. e P. Marchetti. Targeting insulin resistance and beta-cell dysfunction: the role of thiazolidinediones. Diabetes Technol Ther, v.6, n.5, Oct, p.719-31. 2004.

Delaunay, F., A. Khan, *et al.* Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. J Clin Invest, v.100, n.8, Oct 15, p.2094-8. 1997.

Dodd, S., O. Dean, *et al.* N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. Expert Opin Biol Ther, v.8, n.12, Dec, p.1955-62. 2008.

Eliasson, L., F. Abdulkader, *et al.* Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. J Physiol, v.586, n.14, Jul 15, p.3313-24. 2008.

Evans, J. L., I. D. Goldfine, *et al.* Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr Rev, v.23, n.5, Oct, p.599-622. 2002.

Fernandez-Mejia, C. e M. B. Davidson. Regulation of glucokinase and proinsulin gene expression and insulin secretion in RIN-m5F cells by dexamethasone, retinoic acid, and thyroid hormone. Endocrinology, v.130, n.3, Mar, p.1660-8. 1992.

Finkel, T. e N. J. Holbrook. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature, v.408, n.6809, Nov 9, p.239-47. 2000.

Fridlyand, L. E. e L. H. Philipson. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab, v.8, n.2, Mar, p.136-45. 2006.

Gao, Z., J. Reavey-Cantwell, *et al.* Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet beta -cells. J Biol Chem, v.275, n.46, Nov 17, p.36079-85. 2000.

Gauthier, B. R., D. L. Duhamel, *et al.* Synaptotagmin VII splice variants alpha, beta, and delta are expressed in pancreatic beta-cells and regulate insulin exocytosis. Faseb J, v.22, n.1, Jan, p.194-206. 2008.

Gauthier, B. R. e C. B. Wollheim. Synaptotagmins bind calcium to release insulin. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.295, n.6, Dec, p.E1279-86. 2008.

Gerschman, R., D. L. Gilbert, *et al.* Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanisms in common. Science, 119 (3097): 623-6

Green, K., M. D. Brand, *et al.* Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. Diabetes, v.53 Suppl 1, Feb, p.S110-8. 2004.

Gremlich, S., R. Roduit, *et al.* Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic beta cells. Comparison with the effects of fatty acids. J Biol Chem, v.272, n.6, Feb 7, p.3216-22. 1997.

Gurgul, E., S. Lortz, *et al.* Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. Diabetes, v.53, n.9, Sep, p.2271-80. 2004.

Gutteridge, J. M. e B. Halliwell. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci, v.899, p.136-47. 2000.

Haber, C. A., T. K. Lam, *et al.* N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.285, n.4, Oct, p.E744-53. 2003.

Halliwell, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? Cardiovasc Res, v.47, n.3, Aug 18, p.410-8. 2000.

_____. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans, v.35, n.Pt 5, Nov, p.1147-50. 2007a.

_____. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem J, v.401, n.1, Jan 1, p.1-11. 2007b.

Hansen, L. L., Y. Ikeda, *et al.* Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. J Biol Chem, v.274, n.35, Aug 27, p.25078-84. 1999.

Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol, v.11, n.3, Jul, p.298-300. 1956.

_____. Prolongation of the normal life span by radiation protection chemicals. J Gerontol, v.12, n.3, Jul, p.257-63. 1957.

_____. The aging process. Proc Natl Acad Sci U S A, v.78, n.11, Nov, p.7124-8. 1981.

Hohmeier, H. E., A. Thigpen, *et al.* Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1 β -induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. J Clin Invest, v.101, n.9, May 1, p.1811-20. 1998.

Hollenberg, S. M., C. Weinberger, *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. Nature, v.318, n.6047, Dec 19-1986 Jan 1, p.635-41. 1985.

Hoogwerf, B. e R. D. Danese. Drug selection and the management of corticosteroid-related diabetes mellitus. Rheum Dis Clin North Am, v.25, n.3, Aug, p.489-505. 1999.

Houstis, N., E. D. Rosen, *et al.* Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. Nature, v.440, n.7086, Apr 13, p.944-8. 2006.

Jeong, I. K., S. H. Oh, *et al.* The effects of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. Diabetes Res Clin Pract, v.51, n.3, Mar, p.163-71. 2001.

Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, *et al.* Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell, v.62, n.6, Sep 21, p.1189-204. 1990.

Kajimoto, Y. e H. Kaneto. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. Ann N Y Acad Sci, v.1011, Apr, p.168-76. 2004.

Kandil, E., Y. Y. Lin, *et al.* Dexamethasone mediates protection against acute pancreatitis via upregulation of pancreatitis-associated proteins. World J Gastroenterol, v.12, n.42, Nov 14, p.6806-11. 2006.

Karlsson, S., B. Ostlund, *et al.* Beta cell adaptation to dexamethasone-induced insulin resistance in rats involves increased glucose responsiveness but not glucose effectiveness. Pancreas, v.22, n.2, Mar, p.148-56. 2001.

Kinnula, V. L., P. Paakko, *et al.* Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. FEBS Lett, v.569, n.1-3, Jul 2, p.1-6. 2004.

Kohen, R. e A. Nyska. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol, v.30, n.6, Nov-Dec, p.620-50. 2002.

Kovacic, P. e J. D. Jacintho. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. Curr Med Chem, v.8, n.7, Jun, p.773-96. 2001.

Lambillotte, C., P. Gilon, *et al.* Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. J Clin Invest, v.99, n.3, Feb 1, p.414-23. 1997.

Lastra, G., A. Whaley-Connell, *et al.* Low-dose spironolactone reduces reactive oxygen species generation and improves insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle in the TG(mRen2)27 rat. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.295, n.1, Jul, p.E110-6. 2008.

Lenzen, S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. Biochem Soc Trans, v.36, n.Pt 3, Jun, p.343-7. 2008.

Lenzen, S. e C. J. Bailey. Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. Endocr Rev, v.5, n.3, Summer, p.411-34. 1984.

Lenzen, S., J. Drinkgern, *et al.* Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. Free Radic Biol Med, v.20, n.3, p.463-6. 1996.

Li, N., F. Frigerio, *et al.* The sensitivity of pancreatic beta-cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress. Biochem Soc Trans, v.36, n.Pt 5, Oct, p.930-4. 2008.

Li, X., H. Chen, *et al.* Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice: reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic beta-cells. Diabetes, v.55, n.6, Jun, p.1592-604. 2006.

Li, Y., P. Wang, *et al.* Regulation of insulin secretion and GLUT4 trafficking by the calcium sensor synaptotagmin VII. Biochem Biophys Res Commun, v.362, n.3, Oct 26, p.658-64. 2007.

Limbourg, F. P. e J. K. Liao. Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. J Mol Med, v.81, n.3, Mar, p.168-74. 2003.

Liu, H. K., B. D. Green, *et al.* Deleterious effects of supplementation with dehydroepiandrosterone sulphate or dexamethasone on rat insulin-secreting cells under in vitro culture condition. Biosci Rep, v.26, n.1, Feb, p.31-8. 2006.

Lortz, S., M. Tiedge, *et al.* Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. Diabetes, v.49, n.7, Jul, p.1123-30. 2000.

Marchetti, P., S. Del Guerra, *et al.* Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. J Clin Endocrinol Metab, v.89, n.11, Nov, p.5535-41. 2004.

Margis, R., C. Dunand, *et al.* Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. Febs J, v.275, n.15, Aug, p.3959-70. 2008.

Mcewen, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. N Engl J Med, v.338, n.3, Jan 15, p.171-9. 1998.

Mcmahon, M., J. Gerich, *et al.* Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. Diabetes Metab Rev, v.4, n.1, Feb, p.17-30. 1988.

Mitsui, T., H. Azuma, *et al.* Chronic corticosteroid administration causes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. J Neurol, v.249, n.8, Aug, p.1004-9. 2002.

Morgan, D., H. R. Oliveira-Emilio, *et al.* Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. Diabetologia, v.50, n.2, Feb, p.359-69. 2007.

Morgan, D., E. Rebelato, *et al.* Association of Nad(P)H Oxidase with Glucose-Induced Insulin Secretion by Pancreatic Beta Cells. Endocrinology, Jan 15. 2009.

Newsholme, P., E. P. Haber, *et al.* Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. J Physiol, v.583, n.Pt 1, Aug 15, p.9-24. 2007.

Pacher, P., J. S. Beckman, *et al.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev, v.87, n.1, Jan, p.315-424. 2007.

Pi, J., Y. Bai, *et al.* Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes, v.56, n.7, Jul, p.1783-91. 2007.

Pierluissi, J., F. O. Navas, *et al.* Effect of adrenal steroids on insulin release from cultured rat islets of Langerhans. Diabetologia, v.29, n.2, Feb, p.119-21. 1986.

Pirot, P., A. K. Cardozo, *et al.* Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. Arq Bras Endocrinol Metabol, v.52, n.2, Mar, p.156-65. 2008.

Rafacho, A., D. L. Ribeiro, *et al.* Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. Int J Exp Pathol, v.89, n.4, Aug, p.264-75. 2008.

Rafacho, A., L. P. Roma, *et al.* Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. Can J Physiol Pharmacol, v.85, n.5, May, p.536-45. 2007.

Ranta, F., D. Avram, *et al.* Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. Diabetes, v.55, n.5, May, p.1380-90. 2006.

Read, M. L., M. R. Masson, *et al.* A RIPE3b1-like factor binds to a novel site in the human insulin promoter in a redox-dependent manner. FEBS Lett, v.418, n.1-2, Nov 24, p.68-72. 1997.

Rhee, S. G., K. H. Kim, *et al.* Antioxidant defense mechanisms: a new thiol-specific antioxidant enzyme. Ann N Y Acad Sci, v.738, Nov 17, p.86-92. 1994.

Riccardi, C., M. G. Cifone, *et al.* Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GITR and GILZ, two dexamethasone-induced genes. Cell Death Differ, v.6, n.12, Dec, p.1182-9. 1999.

Rizzo, G. e S. Fiorucci. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. Curr Opin Pharmacol, v.6, n.4, Aug, p.421-7. 2006.

Robertson, R. P. Defective insulin secretion in NIDDM: integral part of a multiplier hypothesis. J Cell Biochem, v.48, n.3, Mar, p.227-33. 1992a.

_____. History of Diabetes, the Journal (1952-1991) editor's swan song. Diabetes, v.41, n.1, Jan, p.1-5. 1992b.

Robertson, R. P. e J. S. Harmon. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. Free Radic Biol Med, v.41, n.2, Jul 15, p.177-84. 2006.

Roma, P. L., J. R. Bosqueiro, *et al.* Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression. Free Radic Biol Med, v.Submitted. 2009.

Rousset, M., T. Cens, *et al.* Alone at last! New functions for Ca²⁺ channel beta subunits? Sci STKE, v.2005, n.275, Mar 15, p.pe11. 2005.

Sadowska, A. M., J. Verbraecken, *et al.* Role of N-acetylcysteine in the management of COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, v.1, n.4, p.425-34. 2006.

Schacke, H., W. D. Docke, *et al.* Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. Pharmacol Ther, v.96, n.1, Oct, p.23-43. 2002.

Schafer, F. Q. e G. R. Buettner. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic Biol Med, v.30, n.11, Jun 1, p.1191-212. 2001.

Shao, J., L. Qiao, *et al.* Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.286, n.2, Feb, p.E304-10. 2004.

Souza, K. L.; Gurgul-Convey, E.; Elsner, M.; Lenzen, S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. J Endocrinol 197:139-150; 2008.

Stoecklin, E., M. Wissler, *et al.* Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. Mol Cell Biol, v.17, n.11, Nov, p.6708-16. 1997.

Strack, A. M., R. J. Sebastian, *et al.* Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. Am J Physiol, v.268, n.1 Pt 2, Jan, p.R142-9. 1995.

Sun, Y., Y. G. Tao, *et al.* Modulation of transcription parameters in glucocorticoid receptor-mediated repression. Mol Cell Endocrinol, v.295, n.1-2, Nov 25, p.59-69. 2008.

Tanaka, Y., P. O. Tran, *et al.* A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.19, Sep 17, p.12363-8. 2002.

Tiedge, M., M. Elsner, *et al.* Engineering of a glucose-responsive surrogate cell for insulin replacement therapy of experimental insulin-dependent diabetes. Hum Gene Ther, v.11, n.3, Feb 10, p.403-14. 2000.

Tiedge, M., M. Hohne, *et al.* Insulin secretion, insulin content and glucose phosphorylation in RINm5F insulinoma cells after transfection with human GLUT2 glucose-transporter cDNA. Biochem J, v.296 (Pt 1), Nov 15, p.113-8. 1993.

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

Tonomura, N., K. McLaughlin, *et al.* Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity. J Immunol, v.170, n.5, Mar 1, p.2469-78. 2003.

Toriumi, C. e K. Imai. Altered expression of insulins I and II and their mRNAs in the islets of Langerhans in dexamethasone-induced diabetic rats. Biomed Chromatogr, v.17, n.1, Jan, p.26-32. 2003.

Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol, v.552, n.Pt 2, Oct 15, p.335-44. 2003.

Ushio-Fukai, M., R. W. Alexander, *et al.* Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem, v.274, n.32, Aug 6, p.22699-704. 1999.

Valko, M., D. Leibfritz, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, v.39, n.1, p.44-84. 2007.

Valko, M., H. Morris, *et al.* Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem, v.12, n.10, p.1161-208. 2005.

Valko, M., C. J. Rhodes, *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact, v.160, n.1, Mar 10, p.1-40. 2006.

Vasconcelos, S. M., M. O. Goulart, *et al.* Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos Para Sua Determinação. . Química Nova, v.30, n.5, jul, p.1323-1338. 2007.

Weinhaus, A. J., N. V. Bhagroo, *et al.* Dexamethasone counteracts the effect of prolactin on islet function: implications for islet regulation in late pregnancy. Endocrinology, v.141, n.4, Apr, p.1384-93. 2000.

Wendel, A. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol, v.77, p.325-33. 1981.

Xia, Z., Z. Guo, *et al.* Antioxidant N-acetylcysteine restores myocardial Mn-SOD activity and attenuates myocardial dysfunction in diabetic rats. Eur J Pharmacol, v.544, n.1-3, Aug 21, p.118-25. 2006.

Xu, J., Y. S. Long, *et al.* beta-cell death and proliferation after intermittent hypoxia: Role of oxidative stress. Free Radic Biol Med, Dec 14. 2008.

Yang, S. N. e P. O. Berggren. Beta-cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.288, n.1, Jan, p.E16-28. 2005.

Zawalich, W. S., G. J. Tesz, *et al.* Dexamethasone suppresses phospholipase C activation and insulin secretion from isolated rat islets. Metabolism, v.55, n.1, Jan, p.35-42. 2006.