Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Imunologia Básica e Aplicada

MARIANA RODRIGUES DAVANSO

*Análise imunoendocrinológica da administração de inibidor de
DPP-4 no diabetes mellitus tipo 1 experimental*

Ribeirão Preto – SP

2012

MARIANA RODRIGUES DAVANSO

***Análise imunoendocrinológica da administração de inibidor de
DPP-4 no diabetes mellitus tipo 1 experimental***

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para a obtenção do título de mestre em
Ciências

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador : Dr. Júlio César Voltarelli

Ribeirão Preto – SP

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Davanso, Mariana Rodrigues

Análise imunoendocrinológica da administração de inibidor de DPP-4 no diabetes mellitus tipo 1 experimental. Ribeirão Preto, 2012.

105 p. : il., 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Voltarelli, Júlio César

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Inibidor de DPP-4. 3. GLP-1.
4. Imunoendocrinologica. 5. Estreptozotocina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Rodrigues Davanso

Análise imunoendocrinológica da administração de inibidor de DPP-4 no diabetes *mellitus* tipo 1 experimental

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para a obtenção do título de mestre
em Ciências

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovada em :

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ao Dr. Júlio César Valtarelli, sempre em nossos corações

Agradecimentos

Ao mestre, médico, pesquisador e homem inigualável Dr. Júlio César Voltarelli, a qual passou pelas nossas vidas, deixou como verdadeira lição a necessidade da ousadia em prol da saúde e a humildade como uma de suas mais belas virtudes. Dedico ao senhor este trabalho. Obrigada por ter tido a honra de me tornar uma “menina Voltarelli”.

À Kelen, pela força e garra que tem demonstrado nos últimos tempos. Mesmo diante de situações tristes e difíceis, sempre nos encorajou a não desistir do nosso grupo Voltarelli e perpetuar as sementes já plantadas;

Ao Dr. Eduardo, pelo otimismo, incentivo e bom humor contagiante durante todo o desenvolvimento do meu trabalho, meu muito obrigada;

À Dra. Ângela Leal, pelas dicas e orientações experimentais para o direcionamento do trabalho;

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto e seus funcionários pela competência e carinho. Especialmente a Alê tradutora sempre tão gentil e prestativa. Agradeço aos funcionários da limpeza, da copa, da portaria, do RHL, equipe de segurança e aos motoristas;

Aos funcionários da biblioteca, Rodrigo e Mônica, que sempre estiveram dispostos a ajudar em todos os âmbitos;

Ao Prof. Dr. João Santana e ao Dr. Eduardo Donadi, por nos ampararem e auxiliarem neste processo difícil de modificações e adaptações;

À Ana, secretária do Programa de Imunologia Básica e Aplicada, pelos conselhos, conversas diversas e dúvidas esclarecidas durante esse período, muito obrigada!

Aos membros da banca pela disponibilidade e sugestões;

Às principais agências de fomento à pesquisa científica e tecnológica do país, Fapesp e CNPq, pelo apoio financeiro destinado a este trabalho;

Aos serviços e aos técnicos dos biotérios Central e da FCFRP, por disponibilizarem ajuda sempre;

Aos meus filhos camundongos, muito obrigada por sempre manterem a calma tentando colaborar com os experimentos;

Ao laboratório de Citometria de Fluxo, principalmente à Camila, por entender a extrema importância dos meus inúmeros eventos necessários. Obrigada pela paciência Cá! Carminha, obrigada pela atenção e carinho sempre! Daí e Paty, obrigada;

Ao laboratório de Histologia, à Dani, por sempre nos receber com toda atenção. À doce Josi, por sempre ser tão atenciosa e tratar cada amostra como sua, e a Rosinha, por compartilhar de maneira tão delicada nossas angústias;

Ao laboratório de Transferência Gênica, pelos empréstimos necessários de última hora. Aos amigos adquiridos ao longo desses anos: Lucas (Craúdio), escudeiro fiel, sincero e brilhante, obrigada por fazer os dias de trabalho mais felizes. Baianinho, Ferzinha, Dri, Nath, Ângelo e nosso grande Danilo (ex-Barba), pessoas especialmente diferenciadas;

Aos amigos de laboratório, Lorena, pelo cuidado e disponibilidade em ajudar sempre. Rô e Ana Júlia, pela ajuda e companheirismo em dias difíceis. Kalil, Lucas (Carequinha), Julinha e Gi, obrigada por fazerem parte desta nossa segunda casa e tornarem o ambiente de trabalho mais aconchegante e divertido;

Aos outros amigos de laboratório, Mário (Maurio), muito obrigada pela ajuda nos meus intermináveis Elisás e pelas gargalhadas (mesmo que não houvesse graça). Aos novos amigos, Robson, Rafa e Amanda, mesmo com pouco tempo de convívio é possível perceber que pessoas simples e de caráter ainda existem;

Às duradouras amizades...

Ju, obrigada pelos ensinamentos experimentais, idéias, sugestões e momentos extrovertidos dentro do laboratório. Obrigada pelos ouvidos sempre disponíveis nos momentos difíceis, pelas caronas para diferentes eventos e por ser minha intérprete nos restaurantes japoneses. Muito obrigada amiga!

Furinhos, ou melhor, Furículos, obrigada por estar sempre disposta. Disposta a ajudar, disposta a lutar pelos ideais, disposta a auxiliar o próximo e disposta a brigar por nós. Obrigada por sempre me incentivar (por mais estranha que seja a idéia) e por ser esta pessoa tão adorável. Muito obrigada amiga!

Às minhas irmãs postiças, Marina, por me fazer enxergar os problemas de maneira mais sutil e fazer deles novos projetos de vida. Gisele, pelas discussões imunológicas (nem sempre) e cafés da manhã compartilhados. Obrigada meninas!

Aos amigos que mesmo distantes, estão sempre presentes. Grande Jotobá, irmão protetor para toda a vida. Tarcim e Glads, meus anjinhos iluminados. Jacs e Ninets companheiras de coração, as levarei para onde for. Matheus, meu veterano preferido, sempre tão carinhoso. Obrigada meus amigos fiéis por sempre se preocuparem comigo!

À grande Família Umuaramense, avôs, avós, tios, tias, primos e primas pelo apoio incondicional aos estudos, por sempre preservarem a união de toda a família, pelos longos e divertidos almoços;

Ao homem especial que acompanhou e apoiou cada momento dessa pequena jornada. Preto, obrigada por sempre acreditar em mim, ser meu ombro amigo, respeitar minhas decisões, impulsionar meus sonhos e ser meu amoroso namorado. Te amo!

À minha linda família.

Pai, mãe e irmão muito obrigada pelo amor incondicional!

Pai, sempre forte e determinado me ensinou a não desistir dos nossos sonhos.

Mamis, meiga e sensível me ensinou a enxergar o amor nas pequenas coisas.

Jennifer, linda e alegre sabe me fazer sorrir nas horas difíceis, é meu irmão de alma, minha jóia mais preciosa.

Obrigada meus amores! Amo muito vocês!

À Deus e aos espíritos de luz por sempre indicarem o caminho certo a seguir, me livrarem de todos os perigos e cuidarem de mim!

Muito obrigada a todos!!

RESUMO

Davanso, M.R. **Análise imunoendocrinológica da administração de inibidor de DPP-4 no diabetes mellitus tipo 1 experimental.** 2012. 105p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina. Existem diversas formas de tratamento do DM1, tais como administração de insulina, imunossupressores, transplantes de pâncreas ou de ilhotas pancreáticas, porém todos se mostram ineficientes em algum aspecto. Recentemente, uma nova classe de medicamentos, os inibidores da enzima dipeptidil peptidase 4 (iDPP-4), demonstrou eficiência terapêutica e segurança no tratamento de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 devido ao aumento do hormônio peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1, do inglês glucagon-like peptide-1). Além disso, o uso de inibidores de DPP-4 em modelos experimentais de DM1 demonstrou proteção das células β pancreáticas contra apoptose, estimulação de neogênese de ilhotas pancreáticas e melhora do controle homeostático da glicose. Esse presente projeto teve como objetivo avaliar o perfil imunológico e endocrinológico da administração do inibidor de DPP-4 (MK0431) em DM1 experimental quimicamente induzido por estreptozotocina em camundongos C57Bl/6. Os animais diabéticos foram tratados com ração controle ou ração contendo inibidor de DPP-4 (4g MK0431/Kg de ração) *ad libitum* durante 30 e 90 dias. Durante o tratamento os animais tiveram glicemia, peso e teste de tolerância oral à glicose avaliados. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e o sangue, baço, timo, linfonodos pancreáticos e pâncreas foram coletados. Após 30 dias de tratamento com inibidor, foi observado um aumento do hormônio GLP-1 no soro, além de um padrão imunológico favorável. Dentre os mecanismos imunológicos, foi possível observar um aumento de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) no baço e uma diminuição da citocina IFN- γ no homogenato pancreático. Após 90 dias de tratamento com inibidor, também foi detectado um aumento de insulina e GLP-1 séricos e uma diminuição nos níveis glicêmicos dos animais tratados. Observou-se uma redução no padrão inflamatório no microambiente pancreático, caracterizado pela diminuição das citocinas TNF- α e IFN- γ no homogenato pancreático e por uma redução da frequência de macrófagos $CD11b^+$ nos linfonodos pancreáticos. Os resultados obtidos neste projeto contribuíram para validar a eficácia terapêutica da administração de inibidor de DPP-4 no tratamento do DM1 experimental, bem como os mecanismos imunológicos e endocrinológicos envolvidos. Sem a ocorrência de efeitos tóxicos relevantes, o uso de inibidores de DPP-4 pode se tornar uma alternativa terapêutica para o tratamento do DM1 em humanos, que constitui uma doença crônica associada à baixa qualidade de vida em longo prazo e necessidade de tratamento de alto custo.

Palavras-chave: diabetes mellitus do tipo 1 experimental, inibidor de DPP-4, peptídeo-1 semelhante ao glucagon, imunorregulação

ABSTRACT

Davanzo, M.R. **Immunoendocrinological analyses after administration of dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor on experimental type 1 diabetes.** 2012. 105p. Thesis (Master's Degree) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Type 1 Diabetes Mellitus (DM1) is an autoimmune disease characterized by the selective destruction of the insulin-producing pancreatic β cells. Several forms of treatment for DM1 are current known such as insulin administration, immunosuppressors, pancreas or pancreatic islets transplantation, however, they all are inefficient in some aspect. Recently, a new class of drugs, the dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors (iDPP-4) showed therapeutic efficacy and safety in the treatment with type 2 diabetes mellitus patients due to an increase in the glucagon-like peptide-1 (GLP-1). In addition, the use of DPP-4 inhibitors in experimental models of DM1 has demonstrated a protection of pancreatic β cells against apoptosis, stimulation of pancreatic islets neogenesis and improvement in the glucose homeostatic control. This project evaluated the immunological and endocrinological profile of the DPP-4 (MK0431) inhibitor administration in experimental chemically induced DM1 by streptozotocin in C57BI/6 mice. The diabetic animals were treated with either a normal chow diet or diet containing DPP-4 inhibitor (4g MK0431/Kg of diet) *ad libitum* during 30 and 90 days. During the treatment the animals were evaluated regarding glycemia, weight, and oral glucose tolerance test. At the end of the treatment, the animals were killed and the blood, spleen, thymus, pancreatic lymph nodes and pancreas were collected. After 30 days of treatment with inhibitor, it was observed an increase in the hormone GLP-1 in the serum, besides a favorable immunological pattern. Among the immunologic mechanisms, it was possible to observe an increase in the regulator T cells ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) of the spleen and a decrease in the cytokine IFN- γ in the pancreatic homogenate. After 90 days of treatment with inhibitor, it was also noticed an increase in the insulin and serum GLP-1 levels as well as a decrease in the glycemic levels in the treated animals. It was observed a reduction in the inflammatory pattern in the pancreatic microenvironment characterized by a decrease in the cytokines TNF- α and IFN- γ in the pancreatic homogenate and by a reduction in the frequency of $CD11b^+$ macrophages in the pancreatic lymph nodes. The results obtained in this project contributed to validate the therapeutic efficacy of the DPP-4 inhibitor administration in the treatment of experimental DM1, as well as the immunological and endocrinological mechanisms involved. Without the occurrence of relevant toxic effects, the use of DPP-4 inhibitors may become a therapeutic alternative for the treatment of DM1 in humans, which constitutes a chronic disease associated to low life quality and need for high cost treatment.

Keywords: experimental type 1 diabetes mellitus, dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor, glucagon-like peptide-1, immune regulation

Lista de Figuras

Figura 1. Evolução do peso corporal durante o tratamento com inibidor de DPP-4 via gavagem.	40
Figura 2. Evolução da glicemia basal durante 30 dias de tratamento com inibidor de DPP-4 via gavagem.	41
Figura 3. Acompanhamento da glicemia basal após estímulo com inibidor de DPP-4 via gavagem.....	41
Figura 4. Dosagens de GLP-1 ativo e glucagon no soro dos animais não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 via gavagem após 30 dias..	42
Figura 5. Dosagens de insulina no soro dos animais não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 via gavagem após 30 dias.	43
Figura 6. Frequência das populações de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ no baço de animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor DPP-4 via gavagem após 30 dias.....	44
Figura 7. Frequência das populações de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ nos linfonodos pancreáticos de animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 via gavagem após 30 dias..	44
Figura 8. Análise da ingestão de ração e inibidor de DPP-4 entre as caixas dos animais diabéticos não tratados e tratados com ração contendo inibidor de DPP-4 após 30 e 90 dias.	45
Figura 9. Evolução do peso corporal dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração durante 30 dias..	46
Figura 10. Evolução da glicemia dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração durante 30 dias..	47
Figura 11. Evolução do peso corporal dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração durante 90 dias.	47
Figura 12. Evolução da glicemia dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração durante 90 dias.	48
Figura 13. Teste de tolerância oral a glicose 15 dias após o tratamento com inibidor de DPP-4.	50
Figura 14. Teste de tolerância oral a glicose 30 dias após o tratamento com inibidor de DPP-4.....	51
Figura 15. Teste de tolerância oral a glicose 90 dias após o tratamento com inibidor de DPP-4	51

Figura 16. Dosagem de GLP-1 ativo no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 dias.	53
Figura 17. Dosagem de GLP-1 ativo no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	53
Figura 18. Dosagem de insulina no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	54
Figura 19. Dosagem de glucagon dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	54
Figura 20. Frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ , T CD3 ⁺ CD8 ⁺ e macrófagos CD11b ⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	56
Figura 21. Frequência das populações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	56
Figura 22. Frequência das populações de linfócitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	57
Figura 23. Frequência das populações de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} Foxp3 ⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	58
Figura 24. Frequência das populações de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CTLA4 ⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	58
Figura 25. Frequência das populações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD26 ⁺ e T CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD26 ⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	59
Figura 26. Frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ , T CD3 ⁺ CD8 ⁺ e macrófagos CD11b ⁺ no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	60
Figura 27. Frequência das populações de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} Foxp3 ⁺ no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	62
Figura 28. Frequência das populações de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA4 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CTLA4 ⁺ no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	62
Figura 29. Frequência das populações de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD26 ⁺ e T CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD26 ⁺ no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.	63

Figura 30. Razão entre as porcentagens de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ / T CD3 ⁺ CD8 ⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias..	65
Figura 31. Frequência de macrófagos CD11b ⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias....	66
Figura 32. Dosagem das citocinas IFN- γ e TNF- α presentes no homogenato pancreático dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.....	67
Figura 33. Dosagem das citocinas IL-10 e IL-17 presentes no homogenato pancreático dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 e 90 dias.....	68
Figura 34. Análise histológica do pâncreas dos animais controles selvagens (WT).	69
Figura 35. Análise da massa de células beta produtoras de insulina dos animais controles selvagens (WT).	70
Figura 36. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon dos animais controles selvagens (WT).	71
Figura 37. Análise histológica do pâncreas dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 dias... ..	73
Figura 38. Análise da massa de células beta produtoras de insulina dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 dias.....	74
Figura 39. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 30 dias... ..	75
Figura 40. Análise histológica do pâncreas dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 90 dias.	77
Figura 41. Análise da massa de células beta produtoras de insulina dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 90 dias.....	78
Figura 42. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração após 90 dias.. ..	79

Lista de Tabelas

Tabela 1. Evolução temporal da glicemia dos camundongos diabéticos não tratados e tratados pela dieta contendo o inibidor de DPP-4 incorporado à ração <i>ad libitum</i> após 90 dias de tratamento.	49
Tabela 2. Teste de tolerância oral a glicose dos camundongos diabéticos não tratados e tratados pela dieta contendo o inibidor de DPP-4 incorporado à ração <i>ad libitum</i> após 90 dias de tratamento.	52
Tabela 3. Frequência de células T CD4 ⁺ CD26 ^{bright} e T CD8 ⁺ CD26 ^{bright} no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração <i>ad libitum</i> , após 30 e 90 dias de tratamento.	60
Tabela 4. Frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD8 ⁺ e de macrófagos CD11b ⁺ no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração <i>ad libitum</i> , após 30 e 90 dias de tratamento.	61
Tabela 5. Frequência de células T CD25 ⁺ CD26 ^{bright} e T CD69 ⁺ CD26 ^{bright} no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração <i>ad libitum</i> , após 30 e 90 dias de tratamento.	64
Tabela 6. Frequência de macrófagos CD11b ⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração <i>ad libitum</i> , após 30 e 90 dias de tratamento.	65
Tabela 7. Concentrações das citocinas IFN- γ e TNF- α no homogenato pancreático dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração <i>ad libitum</i> , após 30 e 90 dias de tratamento.	67
Tabela 8. Concentrações das citocinas IL-10 e IL-17 no homogenato pancreático dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração <i>ad libitum</i> , após 30 e 90 dias de tratamento.	68
Tabela 9. Número de ilhotas pancreáticas positivas para insulina em cortes histológicos do pâncreas dos animais diabéticos tratados e não tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração <i>ad libitum</i> , após 30 e 90 dias de tratamento.	80

Lista de Abreviaturas

AIN : *American Institute of Nutrition*

AIN93-M : dieta para manutenção de roedores adultos

CTLA-4 : *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

DAI : doença autoimune

DM1 : Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 : Diabetes *mellitus* tipo 2

DPP-4 : enzima dipeptidil peptidase-4

ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

EM : esclerose múltipla

FoxP3 : *forkhead box 3*

GIP : polipeptídeo insulínico glicose-dependente

GITR : *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*

GLP-1 : peptide-1 semelhante ao glucagon

GLUT2: *Glucose transporter 2*

iDPP-4 : inibidor da enzima dipeptidil peptidase-4

IFN- γ : interferon gama

IL : interleucina

IPEX : *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*

MCP-1 : proteína quimioatraente de monócitos-1

MHC-I : complexo de histocompatibilidade principal classe I

MHC-II : complexo de histocompatibilidade principal classe II

NOD : non obese diabetic

PCNA : antígeno nuclear de célula em proliferação

PD-1: *Programmed Death Ligand 1*

PDX-1: *Pancreatic and Duodenal homeobox 1*

STZ : estreptozotocina

T CD4⁺: linfócitos T CD4⁺

T CD8⁺: linfócitos T CD8⁺

TGF- β : fator de crescimento transformante beta

Th1: linfócitos T helper (auxiliar) do tipo 1

Th17 : linfócitos T helper (auxiliar) do tipo 17

Th2 : linfócitos T helper (auxiliar) do tipo 2

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

Tregs : células T reguladoras

TTOG : Teste de tolerância oral à glicose

WT : *Wild Type* (tipo selvagem)

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Diabetes mellitus do Tipo 1	18
1.2 Incretinas, Inibidores de DPP-4 e Diabetes Mellitus	23
1.3 Imunorregulação e inibidores de DPP-4.....	28
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Modelo de diabetes auto-imune quimicamente induzido por estreptozotocina (STZ) .	32
3.2 Monitoramento da glicemia e peso	32
3.3 Tratamento 1 : Administração de inibidor de DPP4 via gavagem durante 30 dias	32
3.4 Tratamento 2 : Administração de inibidor de DPP4 incorporado a ração durante 30 dias	33
3.5 Tratamento 3 : Administração de inibidor de DPP4 incorporado a ração durante 90 dias	33
3.6 Teste de Tolerância Oral à Glicose	33
3.7 Obtenção de células totais de baço.....	34
3.8 Obtenção de células totais dos linfonodos pancreáticos.....	34
3.9 Imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias do baço e linfonodos pancreáticos	34
3.10 Obtenção do soro.....	35
3.11 Dosagens hormonais séricas	36
3.12 Coleta do pâncreas para análises histológicas	36
3.13 Análises histológicas do pâncreas	36
3.14 Reações de imunohistoquímica do pâncreas	36
3.15 Contagem de ilhotas pancreáticas	37
3.16 Coleta e congelamento do pâncreas para dosagem de citocinas no homogenato pancreático.....	37
3.17 Dosagem de citocinas no homogenato pancreático.....	37
4. ANÁLISE DE DADOS.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Administração de inibidor de DPP-4 (MK0431) via gavagem durante 30 dias	39
5.1.1 Avaliação de peso corporal e glicemia	39
5.1.2 Dosagens hormonais séricas	41

5.1.3 Análise das subpopulações de células T reguladoras no baço e linfonodos pancreáticos	43
5.2 Administração de inibidor de DPP-4 (MK0431) incorporado a ração durante 30 e 90 dias	45
5.2.1 Análise da quantidade de ração/MK0431 consumida pelos animais	45
5.2.2 Avaliação do peso corporal e glicemia	46
5.2.3 Teste de tolerância oral a glicose.....	49
5.2.4 Dosagens hormonais séricas	52
5.2.4.1 Dosagem de GLP-1 ativo.....	52
5.2.4.2 Dosagem de insulina.....	54
5.2.4.3 Dosagem de glucagon.....	54
5.2.5 Análises das populações celulares	55
5.2.5.1 Imunofenotipagem das populações celulares do baço.....	55
5.2.5.2 Imunofenotipagem das populações celulares do timo	60
5.2.5.3 Imunofenotipagem das populações celulares dos linfonodos pancreáticos	64
5.2.6 Dosagem de citocinas presentes no homogenato pancreático.....	66
5.2.7 Análises histológicas	69
5.2.7.1 Análises histológicas dos animais controles selvagens	69
5.2.7.2 Análises histológicas dos animais diabéticos tratados e não tratados após 30 dias	72
5.2.7.3 Análises histológicas dos animais diabéticos tratados e não tratados após 90 dias	76
6. DISCUSSÃO	81
7. CONCLUSÕES	94
8. REFERÊNCIAS	95
9. ANEXO.....	105

1. Introdução

1.1 Diabetes mellitus do Tipo 1

As doenças autoimunes (DAIs) constituem um grupo heterogêneo de doenças que afetam de 3-5% da população geral. Essas doenças decorrem de defeitos nos mecanismos que medeiam a tolerância imunológica aos tecidos próprios, resultando na ativação de mecanismos efetores celulares e humorais, e subsequente destruição tecidual. As DAIs são determinadas pela interação entre fatores genéticos, fatores ambientais e mecanismos de imunorregulação defectivos (Sakaguchi, 2000; Rioux & Abbas, 2005).

Em cada uma destas doenças, a inflamação crônica e muitas vezes intermitente, contribui ao longo do tempo para a destruição de órgãos-alvo. As novas descobertas genéticas também enfatizaram que a identificação dos componentes ambientais que interagem com fatores genéticos dos hospedeiros, será crítica no desenvolvimento de um entendimento mais profundo de autoimunidade, bem como novas abordagens para prevenção e tratamento (revisado por Cho & Gregersen, 2011).

Estudos epidemiológicos da década passada, envolvendo crianças, mostraram que a incidência do diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) está crescendo. Com o início da doença tendendo para idades mais jovens, provavelmente os fatores ambientais atuam expressivamente debilitando a tolerância imunológica no organismo (Vehik & Dabelea, 2011; Ziegler *et al.*, 2011). Em outro estudo, foi previsto que entre 2005 e 2020, os casos de diabetes *mellitus* do tipo 1 irão dobrar entre as crianças européias menores que 5 anos de idade (Patterson *et al.*, 2009).

O DM1 é uma doença autoimune órgão-específica mediada por células T, e caracterizada pela destruição seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina. A etiologia autoimune do DM1 é confirmada pela presença de autoanticorpos circulantes específicos contra antígenos das células β pancreáticas. Estes autoanticorpos são detectados em 85-90% dos indivíduos com DM1 ao diagnóstico (revisado por Roep, 2003; Bluestone *et al.*, 2010). A doença clínica manifesta-se somente após destruição de aproximadamente 80-90% das células β . O processo destrutivo das células β leva à falta do hormônio insulina, que resulta num estado de hiperglicemia, devido ao aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captura de glicose da circulação. Na ausência de insulina, também ocorre um aumento da quebra de gordura e da oxidação de ácidos graxos, que resulta numa excessiva

produção de cetonas. Se não tratados, os distúrbios metabólicos levam progressivamente à depressão do sistema nervoso central, coma e morte. Assim, pacientes necessitam de tratamento permanente com insulina exógena para sobrevivência. Algumas complicações crônicas graves são os problemas vasculares que levam à insuficiência renal, cegueira, doença cardíaca e úlceras crônicas (revisado por Notkins, 2002).

O DM1 possui como tratamento convencional a insulino-terapia subcutânea. Ensaios clínicos de tratamentos com ciclosporina, azatioprina/corticóides, ou anticorpo monoclonal anti-CD3, visando à preservação funcional das células β , vêm sendo realizados com resultados significativos, mas insuficientes para aplicação clínica rotineira (revisado por Palmer et al., 2004). Mais recentemente, o transplante de ilhotas pancreáticas vem sendo proposto como alternativa terapêutica para o DM1 (revisado por Notkins, 2002). Entretanto, há limitações nessa forma de transplantes, as quais incluem a baixa quantidade de doadores para transplantes alogênicos, dificuldade de obtenção das ilhotas e a necessidade de imunossupressão constante (Atkinson & Eisenbarth, 2001). Esse cenário estimula novas pesquisas acerca de alternativas terapêuticas, tais como a diferenciação in vitro de células-tronco em células β humanas para transplante e tratamento com células-tronco adultas (Hussain & Theise, 2004; Voltarelli et al., 2007).

O estágio precoce do DM1 em humanos é caracterizado por uma peri-insulite, devida à infiltração das ilhotas pancreáticas por células mononucleares imunes, incluindo linfócitos T e B, monócitos, células dendríticas e células (Itoh et al., 1993). Embora ela possa refletir uma resposta inflamatória normal em resposta à injúrias teciduais causadas por infecções virais por exemplo, foi mostrado que o infiltrado celular contribui diretamente para a destruição das células β pancreáticas (revisado por Roep, 2003).

Em humanos e modelos animais, macrófagos e células dendríticas são as primeiras células a infiltrarem as ilhotas pancreáticas. Além de apresentarem antígenos das células β aos linfócitos, uma vez ativados produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e óxido nítrico, e contribuem também para a destruição das células β (revisado por Mathis *et al.*, 2001; revisado por Lehuen *et al.*, 2010). Outro recente estudo, forneceu como prova definitiva a presença de linfócitos T CD8⁺ autorreativos em pâncreas de pacientes diabéticos tipo 1 (recentemente diagnosticados e crônicos) através de análises histopatológicas. Estes dados oferecem uma forte razão para intervenções destinadas a prevenção de migração de linfócitos, já que de acordo com o estudo, as células TCD8⁺ podem ser um fator relevante para a progressão da doença (Coppieters *et al.*, 2012).

Estudos em animais demonstraram que as células T têm um papel essencial na patogênese do DM1. A ativação dos linfócitos T autorreativos no DM1 requer o reconhecimento de auto-antígenos expressos pelas células β pancreáticas ou pelas células apresentadoras de antígeno, bem como de sinais co-estimulatórios (Prevot *et al.*, 2010). Embora ambas as células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$ sejam importantes na patogênese, trabalhos mostraram que as células T $CD8^+$ citotóxicas são as principais células efetoras na destruição das células β pancreáticas. Citocinas do padrão Th1 produzidas pelas células T $CD4^+$ e também por T $CD8^+$ são essenciais para patogênese do DM1, pois potencializam respostas imunes mediadas por células, incluindo a ativação de macrófagos. Basicamente, dois mecanismos celulares relacionados à imunopatogenia do DM1 foram descritos, um associado ao reconhecimento (1) e outro associado à ativação (2). No mecanismo (1) a célula T $CD8^+$ é ativada diretamente pelo reconhecimento de antígenos das células β apresentados por moléculas de MHC de classe I presentes nas próprias células β pancreáticas. A ativação das células T $CD8^+$ conseqüentemente provoca a morte das células β por contato célula-célula através das vias de sinalização por Fas/FasL ou perforina/granzima. De acordo com o segundo mecanismo (2), as células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ reconhecem antígenos das células β indiretamente, apresentados por células dendríticas ou macrófagos no contexto de moléculas de MHC de classe II ou classe I, respectivamente. A ativação resultante das células T leva: a apoptose das células β mediada por células T $CD8^+$ citotóxica através do contato celular (receptores de superfície Fas/FasL ou TNF- α /TNF-R) ou lise osmótica devido à ação de mediadores solúveis como granzimas e perforinas, à liberação de citocinas pró-inflamatórias que resulta na ativação de macrófagos com subsequente aumento de sua capacidade citotóxica devido à produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio, e à ativação de células β e estimulação da produção de mediadores de morte celular por elas mesmas (revisado por Mathis *et al.*, 2001; Dilorrenzo & Serreze, 2005).

Outro subtipo celular importante na patogênese do DM1, e outras doenças autoimunes, são as células T reguladoras (Tregs). As células Tregs atuam na supressão da ativação imune, funcionando como mediadores críticos da homeostasia imune e da autotolerância (Fontenot & Rudensky, 2005; Josefowicz & Rudensky, 2009; Shevach, 2009). As células Tregs, na sua maioria, são células $CD4^+$ que expressam constitutivamente a molécula CD25 (cadeia α do receptor de IL-2, IL-2R α). As Tregs naturais são produzidas normalmente pelo timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras (já com função supressora), constituem aproximadamente 2-10% da população de células T $CD4^+$ e

expressam constitutivamente o fator de transcrição Foxp3 (do inglês, *forkhead transcription factor*) (revisado por Sakaguchi, 2004). A busca por um marcador específico de células Tregs em camundongos resultou na identificação do fator de transcrição Foxp3, que é expresso em células Tregs mas não em células T recentemente ativadas. Foi mostrado que as células Tregs CD4⁺CD25⁺ expressam especificamente o gene regulador *Foxp3*, que codifica um fator de transcrição chamado de *forkhead transcription factor 3*, que controla seu desenvolvimento e função (Fontenot & Rudensky, 2005).

Além da geração tímica de células Tregs naturais CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, células T periféricas convencionais podem adquirir a expressão de Foxp3 na periferia e converter-se em células Tregs *in vivo* após estimulação antigênica crônica, em condições de linfopenia ou pela exposição à citocinas reguladoras como IL-10 e TGF-β (Apostolou & Von Boehmer, 2004; Curotto De Lafaille *et al.*, 2004). Recentemente, um estudo avaliou células Tregs em humanos e camundongos quanto à expressão de seus fatores de transcrição. Foi possível afirmar que o fator de transcrição Helios (da família Ikaros) é potencialmente um marcador específico de Tregs derivadas do timo (Tregs naturais), enquanto um fenótipo de células Foxp3⁺Helio⁻ é gerado na periferia, denominadas Tregs induzidas (Thornton *et al.*, 2010).

A subpopulação de células Tregs constitui um ponto comum entre a tolerância central e periférica. Assim como as células Tregs, as células T efetoras são submetidas a um processo de seleção tímica comum, e posteriormente um controle periférico. O balanço entre as células T reguladoras e efetoras geralmente é dinamicamente mantido, bem como a estimulação antigênica responsável pela ativação de ambas. Variações ou anomalias genéticas podem afetar este balanço, e assim induzir ou predispor a doenças autoimunes (Wing & Sakaguchi, 2010).

As Tregs têm um papel essencial no controle de células T auto-reativas, uma vez que a depleção ou alteração da função dessas células T CD4⁺CD25⁺ leva ao desenvolvimento de doenças auto-imunes em uma grande variedade de animais normais (revisado por Sakaguchi, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2006a). Entretanto, vários estudos têm demonstrado que a função das células Tregs não é limitada à prevenção de auto-imunidade, mas são importantes no controle todas as formas de respostas imunes no contexto de inflamação, infecção, alergia, transplantes e imunidade tumoral (Hori & Sakaguchi, 2004; Randolph & Fathman, 2006; Sakaguchi *et al.*, 2006b).

As Tregs têm um papel central no controle de respostas imunes em humanos e em modelos animais (Suri-Payer & Frittsching, 2006). De fato, a deleção de Tregs leva a expansão clonal de células T autorreativas (Danke *et al.*, 2004) e defeitos numéricos e/ou

funcionais foram reportados em Tregs isoladas de PBMC de pacientes com esclerose múltipla, DM1, psoríase, miastenia grave, artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil e lúpus (Lindley *et al.*, 2005; Baecher-Allan & Hafler, 2006; Randolph & Fathman, 2006).

Desde o seu estabelecimento, a linhagem de camundongos NOD (*non-obese diabetic*) tem sido usada para estudar as características do diabetes autoimune experimental, pois assemelha-se clinicamente ao DM1 em humanos. Uma diferença relevante é que a doença em camundongos NOD é totalmente determinada geneticamente e em humanos depende de fatores genéticos e ambientais. O início do diabetes ocorre entre 12 e 14 semanas após o nascimento em fêmeas e um pouco mais tarde nos machos. A maioria das células dos infiltrados inflamatórios são células T CD4⁺, mas células T CD8⁺, células NK, células B, células dendríticas e macrófagos também podem ser observadas (Anderson & Bluestone, 2005).

Além do modelo dos camundongos NOD, existe um modelo de diabetes que pode ser induzido quimicamente pela administração de estreptozotocina (STZ) em várias linhagens de camundongos. A STZ é um análogo da N-acetilglucosamina e foi primeiramente isolada do microorganismo *Streptomyces achromogenes*, sendo que em altas doses induz, quase que de imediato, uma hiperglicemia. Este composto químico é muito similar à molécula de glicose, e pode ser transportado para o interior das células via proteína transportadora de glicose 2 (GLUT2), mas ela não é reconhecida pelos demais transportadores de glicose. Isso explica a toxicidade sítio-específica em células β , uma vez que esse tipo celular apresenta altos níveis de expressão do transportador GLUT2. Entretanto, altas doses de STZ promovem uma alta citotoxicidade, levando a uma lesão muito grave nos rins. Esse efeito pode ser reduzido pela administração de pequenas e múltiplas doses de STZ, nesse caso a hiperglicemia aparece dentro de duas semanas após a primeira dose da droga (revisado por Tesch & Nikolic-Paterson, 2006).

A administração de múltiplas doses baixas de estreptozotocina mostrou-se capaz de induzir um diabetes deficiente de insulina em roedores caracterizado pela destruição de ilhotas pancreáticas (Leiter, 1982). Além disso, diferentes estudos demonstraram que este modelo é composto por uma destruição mediada por células do sistema imunológico (Paik *et al.*, 1980; Leiter, 1982).

A evolução do diabetes no modelo quimicamente induzido com múltiplas doses de STZ é mediada por um precoce infiltrado de macrófagos nas ilhotas, uma apresentação eficiente dos antígenos diabetogênicos liberados pela droga e recrutamento de células T. Macrófagos desempenham sua função patogênica por gerar indiretamente óxido nítrico, via

produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α . Além disso, já foi demonstrado que a combinação de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e a geração de óxido nítrico são responsáveis pelo dano à célula β em um modelo de diabetes induzido por múltiplas doses de STZ em ratos *Dark Agouti* (revisado por Mensah-Brown *et al.*, 2006).

Fukuda e colaboradores (2008) observaram em camundongos tratados com múltiplas doses de STZ que um dia após a última dose de STZ ocorre o pico de apoptose das células β pancreáticas, ao 11º dia caracteriza-se pelo pico de infiltrado inflamatório nas ilhotas e no 23º dia após o tratamento com a droga pode-se observar uma perda drástica da massa de células β e consequentemente hiperglicemia sustentada (Fukuda *et al.*, 2008). O diabetes induzido por STZ é mais pronunciado em machos C57BL/6 (linhagem de camundongo mais utilizada) do que em fêmeas da mesma linhagem (revisado por Tesch & Nikolic-Paterson, 2006).

1.2 Incretinas, Inibidores de DPP-4 e Diabetes Mellitus

A alimentação provoca a secreção de múltiplos hormônios gastrointestinais envolvidos na regulação da motilidade intestinal, secreção de ácidos graxos, contração da vesícula biliar e absorção de nutrientes. Os hormônios intestinais também facilitam a absorção de glicose através da estimulação da secreção de insulina pelo pâncreas endócrino (Drucker & Nauck, 2006).

Elrick *et al.* (1964) avaliaram quantitativamente a resposta de humanos adultos metabolicamente normais à administração oral ou intravenosa da glicose. A concentração de glicose, após administração por ambas as vias, foi similar. Em contraste, os níveis de insulina no plasma mostraram uma importante diferença: a administração de glicose oral resultou em um aumento significativo de insulina plasmática, enquanto a glicose intravenosa acarretou um aumento menor de insulina no plasma. Este resultado sugeriu a existência de um estímulo adicional para a secreção da insulina, como um fator intestinal cuja liberação dependesse dos níveis de glicose. Esses fatores ficaram conhecidos posteriormente como incretinas (Elrick *et al.*, 1964).

As incretinas são responsáveis pela transmissão endócrina de um estímulo do intestino para as células β no pâncreas. No sentido original, refere-se somente a um transmissor endócrino de liberação da insulina, sendo que sua elevação no sangue estimula a liberação da secreção de insulina (Creutzfeldt, 1979). Os critérios para serem considerados incretinas foram: o hormônio deve ser liberado pelas células endócrinas intestinais depois da ingestão de nutrientes, especialmente a glicose; a circulação hormonal deve estimular a secreção de

insulina em uma concentração a qual é facilmente observada depois da ingestão de um nutriente; o hormônio deve liberar insulina apenas em níveis elevados de glicose (glicose-dependente) (Creutzfeldt, 2005).

A purificação e caracterização da primeira incretina, o polipeptídeo insulínico glicose-dependente (GIP), ocorreu na década de 1970. Ela foi purificada de um extrato intestinal de porco e possui um fraco efeito na secreção de ácido gástrico, mas uma potente ação insulínica (Dupre *et al.*, 1973). Embora o GIP seja um forte estimulador para secreção de insulina glicose-dependente, a remoção do mesmo de extratos de intestino de ratos via imunoabsorção não eliminou o efeito das incretinas. Esse resultado sugeriu a existência de outros fatores hormonais com atividade semelhante ao GIP. O GIP é um hormônio formado por 42 aminoácidos liberado pelas células K do intestino em resposta a ingestão nutricional. Apesar de reduzir a apoptose de ilhotas em ratos diabéticos e ser um possível candidato para tratamento de diabetes em humanos, observou-se uma relativa resistência aos efeitos insulínicos quando GIP exógeno era administrado em pacientes (Baggio & Drucker, 2006).

O segundo e o mais importante hormônio da classe das incretinas identificado foi o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1, do inglês *glucagon-like peptide-1*). A maioria do GLP-1 é produzido pelas células L do íleo distal e cólon. Assim como o GIP, os níveis de GLP-1 também aumentam minutos após a alimentação. Uma combinação de sinais endócrinos e neurais promove a rápida estimulação intestinal para a secreção do GLP-1 (Drucker & Nauck, 2006). O GLP-1 estimula a biossíntese e a secreção da insulina, tem uma importante ação na motilidade gástrica e promove a saciedade (Stoffers, 2004). Porém, possui uma meia-vida curta na circulação (3-5 minutos), devido à inativação por proteases, tais como a dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) e outras endopeptidases (Orskov *et al.*, 1993).

Tanto o DM1 quanto o diabetes tipo 2 (DM2), resultam em uma redução de massa de células β pancreáticas não-funcionais. Em pacientes com DM2, foi demonstrado que o GLP-1 e seus análogos não somente diminuem o nível de glicose do sangue, como também participam na sinalização de vias que estimulam a proliferação de células β e inibem a apoptose dessas células (Baggio & Drucker, 2006; Drucker & Nauck, 2006; Xue *et al.*, 2008). Farilla *et al.* (2003) cultivaram ilhotas pancreáticas humanas na ausência ou presença de GLP-1 e analisaram a viabilidade celular e expressão de fatores pró-apoptóticos (caspase-3) e antiapoptóticos (*Bcl-2*). Os resultados mostraram que o GLP-1 preserva a morfologia, funcionamento e inibe a apoptose das células (Farilla *et al.*, 2003). Em outro estudo

semelhante, foi observado um aumento da expressão de NF- κ B e de genes antiapoptóticos (proteína-2 e *Bcl-2*) nas células β (Buteau *et al.*, 2004).

O exendin-4 foi a primeira molécula análoga ao GLP-1 (incretino-mimético) que recebeu aprovação para ser utilizado clinicamente no tratamento de pacientes com DM2 (Schnabel *et al.*, 2006). O Exenatide, versão sintética do exendin-4, é um peptídeo formado por 39 aminoácidos originalmente isolado da secreção salivar do lagarto *Heloderma suspectum* (Eng *et al.*, 1992). O exendin-4 é também um potente agente insulínico e apresenta meia-vida maior *in vivo* ao ser comparado com GLP-1 endógeno.

No modelo de DM2, no qual os ratos foram pancreatizados, foi demonstrado que esse análogo do GLP-1 promove a regeneração e expansão da massa de células β pancreáticas, através do processo de neogênese e proliferação. Além disso, o exendin-4 também reduziu os níveis de glicose no plasma através do aumento da liberação e síntese de insulina (Xu *et al.*, 1999). O tratamento de ratos Wistar neonatos diabéticos (DM2 induzido por estreptozotocina) com GLP-1 ou exendin-4 demonstrou a regeneração de células β e melhora da função pancreática a curto e longo prazo (Tourrel *et al.*, 2001). Özyazgan *et al.* (2005) avaliaram os efeitos vasculares do GLP-1 ou exendin-4 em ratos com DM2 induzido por estreptozotocina-nicotinamida, e demonstram uma queda significativa dos níveis de glicose sanguínea e uma normalização do tônus vascular, um mês após o tratamento (Ozyazgan *et al.*, 2005).

Grande parte dos estudos com GLP-1 ou seus análogos foram realizados em pacientes com DM2, mas em virtude de suas ações antidiabéticas, alguns estudos passaram a testar o potencial dos mesmos em pacientes com DM1. Behme *et al.* (2003) demonstraram uma melhora nos níveis de glicose em pacientes com DM1, porém sem secreção endógena de insulina, após administração subcutânea de GLP-1 (Behme *et al.*, 2003).

Apesar dos análogos de GLP-1, como exendin-4, estarem sendo avaliados no tratamento de pacientes com DM1, ainda existe pouca informação sobre sua eficácia terapêutica nessa doença. O transplante de ilhotas pancreáticas em pacientes com DM1 pode reduzir ou eliminar a necessidade do uso de insulina. Pesquisadores avaliaram o uso de exendin-4 após o transplante de ilhotas e demonstraram uma estimulação da secreção de insulina nos pacientes transplantados (Ghofaili *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica lançou novos medicamentos para tratamento de pacientes com DM. Uma nova classe de medicamentos surgiu com base em uma enzima descrita pelos pesquisadores Hopsu-Havu & Glenner, em 1966 (Hopsu-Havu & Glenner, 1966). Essa enzima é conhecida como dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) ou CD26. A

DPP-4 é uma proteína multifuncional pertencente ao grupo de oligopeptidases, enzimas que clivam especificamente peptídeos com resíduos de prolina ou alanina na sua penúltima posição aminoterminal. Com a remoção desses resíduos, a enzima inativa a respectiva molécula alvo, tal como o GLP-1 (Yaron & Naider, 1993; Rawlings & Barrett, 1994). A DPP-4 é expressa na forma solúvel no plasma e também na superfície de diversos tipos celulares, incluindo células epiteliais, endoteliais e linfócitos (revisado por De Meester *et al.*, 1999). Essa nova classe de medicamentos é chamada de inibidores de DPP-4. Desde que a terapia baseada em GLP-1 foi originada, uma estratégia para inibição desta enzima tem sido explorada e desta forma, vários inibidores de DPP-4 foram e têm sido desenvolvidos.

Desde que a terapia baseada em GLP-1 foi originada, uma estratégia para inibição da enzima DPP-4 tem sido explorada e desta forma, vários inibidores de DPP-4 foram e têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos. Marguet *et al.* (2000) demonstraram que camundongos CD26^{-/-} apresentam níveis aumentados de insulina circulante (estimulados pela glicose) e GLP-1. Além disso, a utilização de inibidores de DPP-4 melhorou a tolerância à glicose em camundongos selvagens, mas não em camundongos CD26^{-/-}, confirmando assim, o papel importante da CD26 ou DPP-4 na homeostasia da glicose (Marguet *et al.*, 2000).

Os inibidores DPP-4 não são classificados como incretino-miméticos, mas sim como drogas capazes de aumentar a disponibilidade e a concentração de GPL-1 endógeno no organismo através da inibição de sua degradação. Os inibidores de DPP-4 são de administração oral, possuem ação longa, não apresentam efeitos sobre o sistema nervoso central (como náuseas e vômitos) e não apresentaram efeito sobre o peso, quando comparados aos medicamentos incretino-miméticos (revisado por Verspohl, 2009). Assim, o uso de inibidores DPP-4 tornou-se uma opção terapêutica mais atrativa para endocrinologistas e pacientes diabéticos do que os medicamentos incretino-miméticos (GLP-1 e análogos).

Dentre alguns exemplos de inibidores de DPP-4 estão a sitagliptina (MK-0431, Januvia; MerckSharp&Dhome) e a vildagliptina (LAF237, Galvus; Novartis). Ambos apresentam longa duração e necessitam somente de uma ou duas administrações ao dia, respectivamente. Devido sua eficiência e segurança associada à administração oral, é possível que os inibidores de DPP-4 venham a ser primeira linha de tratamento para pacientes com DM2 (Ahren, 2007). Diferentes estudos utilizando grande número de pacientes DM2 observaram que o uso somente de sitagliptina ou em conjunto com outros medicamentos, apresentou uma grande melhora no quadro da doença associado ao menor risco de picos de hipoglicemia e auxílio na perda de peso (Iwamoto *et al.*, 2010; Arechavaleta *et al.*, 2011).

Diante do seu potencial terapêutico, os inibidores de DPP-4 passaram também a ser avaliados no tratamento de DM1. O primeiro estudo utilizando inibidor de DPP-4 (sitagliptina) foi realizado em pacientes recém-diagnosticados com DM1 tratados com imunossupressão em altas doses seguida pelo transplante de células-tronco hematopoiéticas. Neste estudo, dois pacientes que retomaram o uso de insulina após um período pós-transplante livre de insulina, foram tratados com sitagliptina e tornaram-se livres de insulina novamente, apresentando concomitantemente um aumento dos níveis de peptídeo-C (Couri *et al.*, 2009). Recentemente, um estudo piloto composto por 20 pacientes com DM1, avaliou a eficácia clínica da sitagliptina sobre o controle da glicemia. Esse estudo mostrou um controle da glicemia com uso da sitagliptina e até mesmo a redução dos níveis de insulina necessários no pós-prandial (Ellis *et al.*, 2011).

No modelo de DM1 induzido por estreptozotocina em ratos Wistar, o tratamento com inibidor de DPP-4 (P32/98) por sete semanas mostrou proteção das células β contra apoptose, estimulação de neogênese de ilhotas e controle homeostático da glicose (Pospisilik *et al.*, 2003). Em outro estudo, camundongos C57Bl/6 com DM1 induzido por estreptozotocina e tratados com sitagliptina (inibidor de DPP-4) na dieta, apresentaram uma diminuição dos níveis de DPP-4 no plasma. Nesse mesmo estudo, foi avaliada a ação do sitagliptina após tratamento dos animais diabéticos com transplante de ilhotas pancreáticas. Observou-se um aumento da produção de insulina pelo pâncreas e um aumento no número de “novas” ilhotas no grupo que usou sitagliptina após o transplante. Os resultados sugerem, portanto, que a inibição da enzima DPP-4 é capaz de preservar as ilhotas *in vivo* e potencializar o efeito do transplante (Kim *et al.*, 2008).

Em 2009, Kim e colaboradores (Kim *et al.*, 2009) avaliaram o efeito terapêutico do inibidor de DPP-4 (sitagliptina) em camundongos NOD após transplante de ilhotas pancreáticas. O tratamento com sitagliptina antes e após o transplante de ilhotas resultou em maior sobrevida do enxerto, enquanto o grupo controle sem tratamento com sitagliptina resultou em pequenos benefícios terapêuticos. Além disso, o tratamento prévio com sitagliptina resultou em uma diminuição da insulite *in vivo* (Kim *et al.*, 2009). A utilização de inibidor de DPP-4 em animais NOD foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos após duas semanas de tratamento. E após quatro e seis semanas de tratamento, o inibidor foi capaz de reverter o diabetes em aproximadamente 70% dos animais (Tian *et al.*, 2010).

Tendo em vista a grande relevância do uso de inibidores de DPP-4 no tratamento do DM2 observados na literatura e alguns trabalhos mostrando também sua eficácia no

tratamento do DM1, esta linha de medicamentos representa uma nova e promissora estratégia terapêutica para o *diabetes mellitus*.

1.3 Imunorregulação e inibidores de DPP-4

Os linfócitos T e B ativados expressam um número de moléculas de superfícies que estão ausentes, ou presentes em baixas concentrações nos linfócitos em repouso. Dentre estas moléculas de ativação estão as glicoproteínas com atividade enzimática, como as proteases, glicosidases e fosfatases. Estas ectoenzimas são amplamente expressas em diferentes tecidos e podem realizar as mesmas funções na homeostase e no metabolismo celular dos linfócitos, assim como ocorre com outras células. Dentre estas moléculas, a dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) é uma glicoproteína de membrana presente na maioria das células dos mamíferos (Fleischer, 1994). O “Segundo Workshop Internacional em Antígenos de Diferenciação Humana” em Boston (1986) designou termo CD26 para a glicoproteína DPP-4 (Knowles, 1986).

Em geral, a ativação da célula T requer no mínimo dois sinais, o primeiro sinal é fornecido através da estimulação do complexo TCR (*T-cell receptor*) pelo antígeno e o segundo sinal, ocorre através de moléculas coestimulatórias. A molécula CD26 representa uma importante atividade coestimulatória e apresenta-se freqüentemente expressa em células TCD4⁺ e TCD8⁺ ativadas (Morimoto & Schlossman, 1998), as quais geralmente expressam outros marcadores de ativação em alta densidade, como CD25 e CD45 (Gorrell, 2005). A molécula CD26 está ausente na maioria dos linfócitos T em repouso, porém sua expressão aumenta com a ativação dos linfócitos T e após a cultura dessas células com IL-2. Assim, o CD26 tornou-se um marcador adequado para caracterizar células T ativadas (Fleischer, 1987).

Uma subpopulação de linfócitos caracterizadas pela expressão de CD26 em alta densidade na sua superfície, nomeada como células T CD26^{bright}, foi associada a população de linfócitos T Th1. Ao cultivar células mononucleares de sangue periférico com diferentes citocinas, foi possível associar o aumento da expressão de CD26 na superfície das células com a presença de IFN- γ e IL-12. Sugerindo assim, que a regulação da expressão de CD26 estaria correlacionada com a produção de citocinas Th1 (Cordero et al., 1997; Willheim et al., 1997).

O número de células T CD26^{bright} e/ou a densidade do antígeno CD26 estão aumentados durante as fases ativas de diferentes doenças autoimunes, e este subtipo celular também pode ser encontrado nos sítios de inflamação (Hafler *et al.*, 1985; Gerli *et al.*, 1996; Mizokami *et al.*, 1996). Foi observado um aumento do número de células T CD26^{bright} na

artrite reumatóide, esclerose múltipla, tiroidite de Hashimoto e outras doenças inflamatórias (revisado por De Meester *et al.*, 1999).

A utilização de inibidores de DPP-4 foi a abordagem escolhida para avaliação do papel da enzima que atua sobre a molécula CD26 na regulação do sistema imunológico. A inibição da DPP-4 na superfície das células não somente suprime a proliferação de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias, mas também estimula a secreção de citocinas anti-inflamatórias (Reinhold *et al.*, 1997a; Reinhold *et al.*, 1997b).

Desde modo, o uso de inibidores de DPP-4 poderia estar associado com a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias e a supressão da ativação de linfócitos T, conseqüentemente contribuiria para o controle da resposta exacerbada existente em um modelo de DM1. Além do papel dos inibidores em atuar na regulação da ativação de linfócitos T via CD26, existe a possível capacidade dos inibidores em induzir um aumento na frequência de células T reguladoras.

As células Tregs $CD4^+CD25^+$ produzem citocinas reguladoras tais como IL-10, IL-4 e TGF- β (*transforming growth factor- β*), e também expressam preferencialmente as moléculas CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, regulador negativo da ativação de células T; receptor para CD80 e CD86), GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor*) e PD-1 (*programmed death-1*) importantes para manutenção do seu papel imunossupressor (revisado por Sakaguchi, 2004).

Em camundongos NOD, o defeito das Tregs parece ser simplesmente um problema numérico, uma vez que estas parecem funcionar normalmente e conferem proteção quando da transferência adotiva (Salomon *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002). Nesse contexto, transferência de esplenócitos depletados de células $TCD4^+CD25^+$ resulta num desenvolvimento mais rápido do diabetes. Ao contrário, a transferência de $CD4^+CD25^+$ atrasa o início da doença, sugerindo que as Tregs realmente conferem proteção (Salomon *et al.*, 2000; Gregori *et al.*, 2003).

Em humanos com DM1, foi sugerido que a função da Tregs pode ser defectiva. Kukreja *et al.* (2002) demonstraram um número diminuído de células $CD4^+CD25^+$ no sangue periférico de pacientes com DM1 em relação aos controles (Kukreja *et al.*, 2002), mas outro trabalho mostrou percentagens normais de Tregs quando comparados a indivíduos saudáveis (Lindley *et al.*, 2005).

Um estudo recente sugeriu que o exendin-4 é capaz de induzir proliferação de células β pancreáticas e de aumentar frequência *in vivo* de células Tregs em camundongos NOD tratados. O tratamento dos camundongos NODs não somente proporcionou um aumento de células Tregs como também induziu a produção de IL-10, indicando uma possível mudança

da resposta imune para um padrão Th2 (Xue *et al.*, 2008). Em outro estudo, Hadjiyanni *et al.* (2008) demonstraram que camundongos NODs tratados durante 26 semanas com GLP-1 apresentam redução da insulite, aumento de massa de células β e melhora da tolerância à glicose. Resultados demonstraram um aumento do número de células TCD4⁺ e TCD8⁺ nos linfonodos periféricos, mas não no baço dos animais. Foi observado também uma redução de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no timo, mas não nos linfonodos periféricos. Sugeriu-se assim, que somente a ativação de receptores de GLP-1 não foi suficiente para uma produção substancial de ações anti-apoptóticas ou imunomoduladoras, sendo necessários futuros estudos para a prevenção da destruição de células β pancreáticas por mecanismos autoimunes (Hadjiyanni *et al.*, 2008).

Além dos medicamentos incretino-miméticos, os inibidores de DPP-4 também atuam sobre a população de células Tregs. Camundongos NODs tratados durante 2 e 4 semanas com inibidor de DPP-4 via oral (NVP-DPP728), apresentaram um aumento na frequência de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no timo (Tian *et al.*, 2010).

2. Objetivos

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a eficácia terapêutica da administração de inibidor de DPP-4 no tratamento de DM1 experimental induzido por estreptozotocina.

Objetivos específicos

1- Avaliar a resposta clínica e endocrinológica dos animais diabéticos após 30 e 90 dias de tratamento:

- Avaliar a evolução glicêmica, peso corporal e tolerância a glicose;
- Avaliar os níveis de insulina, glucagon, GLP-1 séricos;
- Avaliar histopatologia (morfologia, integridade e composição das ilhotas pancreáticas);
- Avaliar quantitativamente as ilhotas pancreáticas.

2- Identificar os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta terapêutica ao inibidor de DPP-4:

- Avaliar a presença e frequência de células T reguladoras (Foxp3⁺/CTLA-4⁺) e outros subtipos celulares no baço, timo e linfonodos pancreáticos;
- Avaliar as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias relacionadas aos subtipos celulares T_H1, T_H2, T_H17 e Tregs presentes no pâncreas.

3. Material e métodos

3.1 Modelo de diabetes auto-imune quimicamente induzido por estreptozotocina (STZ)

Após jejum de 12 horas, o diabetes foi induzido em camundongos C57Bl/6 machos, com 8 semanas de idade, através da administração intraperitoneal de 5 doses (42 mg/kg) diárias e consecutivas de estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, USA). A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio a 0,05 M gelado (pH 4,0–4,5) e usada dentro de 15 minutos. Os animais foram considerados diabéticos após 2 medições consecutivas maiores que 250 mg/dL de glicose sanguínea na ausência de jejum.

3.2 Monitoramento da glicemia e peso

As taxas glicêmicas e os pesos dos camundongos induzidos com STZ foram monitorados semanalmente pela manhã na ausência de jejum. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal e a taxa de glicose foi avaliada no glicosímetro *Accu-Check Active* (Roche Diagnostics, Abbott Park, IL, USA).

3.3 Tratamento 1 : Administração de inibidor de DPP4 via gavagem durante 30 dias

Após serem considerados diabéticos (após 2 medições consecutivas maiores que 250 mg/dL de glicose sanguínea na ausência de jejum), os animais foram tratados duas vezes ao dia (9:00h e 16:00h) oralmente com inibidor de DPP-4 MK0431 (MerckSharp&Dhome, Whitehouse Station, NJ, USA). Os animais foram devidamente subdivididos em 3 grupos. O grupo G100 (n=5) recebeu durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias de 100mg/Kg de animal de MK0431 via gavagem. O grupo G200 (n=5) recebeu durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias de 200mg/Kg de animal de MK0431 via gavagem. O grupo G300 (n=5) recebeu durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias de 300mg/Kg de animal de MK0431 via gavagem. E por fim, grupo não tratado (n=6), caracterizado pelos animais diabéticos, os quais não receberam nenhum tipo de tratamento. Os animais foram avaliados durante 30 dias de tratamento. Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados para coleta de sangue (soro) e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical.

3.4 Tratamento 2 : Administração de inibidor de DPP4 incorporado a ração durante 30 dias

Após serem considerados diabéticos, foi proporcionado aos animais dieta controle (AIN-93M Purificada) (Reeves *et al.*, 1993) (n=6) ou dieta contendo inibidor de DPP-4 MK0431 (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) (n=6) *ad libitum* durante 30 dias consecutivos. Ambas as dietas foram preparadas pela PragSoluções Biociências Comércio e Serviços Ltda (CNPJ: 03.420.938/0001-59). Os animais foram avaliados durante 30 dias de tratamento. Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados para coleta de sangue (soro) e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical.

3.5 Tratamento 3 : Administração de inibidor de DPP4 incorporado a ração durante 90 dias

Após serem considerados diabéticos, foi proporcionado aos animais dieta controle (AIN-93M Purificada) (Reeves *et al.*, 1993) (n=6) ou dieta contendo inibidor de DPP-4 MK0431 (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) (n=6) *ad libitum* durante 90 dias consecutivos. Ambas as dietas foram preparadas pela PragSoluções Biociências Comércio e Serviços Ltda (CNPJ: 03.420.938/0001-59). Os animais foram avaliados durante 90 dias de tratamento. Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados para coleta de sangue (soro) e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical.

3.6 Teste de Tolerância Oral à Glicose

Após 12 horas de jejum, foi realizado o teste de tolerância oral à glicose nos animais diabéticos tratados ou não, bem como animais saudáveis (WT-selvagens). A solução de glicose foi administrada via gavagem (oral) na concentração de 1,5 mg por grama de animal e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração desta. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal nos determinados períodos de tempo e a taxa de glicose foi avaliada através do glicosímetro *Accu-Check Active* (Roche Diagnostics, Abbott Park, IL, USA).

3.7 Obtenção de células totais de baço

Após a eutanásia dos animais, os baços foram coletados e colocados em pequenas placas de Petri contendo 3 ml de PBS 1X sobre gelo. Em seguida, o tecido foi divulsionado até obtenção de uma suspensão celular turva. Essa suspensão foi centrifugada a 1200rpm durante 10 min, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 4 ml de tampão de lise (somente para as células do baço, em decorrência da grande quantidade de hemácias) Tris 0,17M e NH₄Cl 0,16M por 4 minutos. Para inativar a lise das células foi acrescentado 3-5 ml de RPMI completo (10% soro fetal bovino). As células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min, a 4°C. Posteriormente as células foram contadas na câmara de *Neubauer* e a concentração celular foi ajustada para serem feitas as marcações de superfície e intracelulares com anticorpos monoclonais.

3.8 Obtenção de células totais dos linfonodos pancreáticos

Após a eutanásia dos animais, os linfonodos pancreáticos foram coletados e colocados em pequenas placas de Petri contendo 3 ml de meio de RPMI completo (10% soro fetal bovino) sobre gelo. Em seguida, o tecido foi divulsionado até obtenção de uma suspensão celular turva. Essa suspensão foi filtrada (40 µm, *BD Falcon, Cell Strainer*, BD, USA) e depois centrifugada a 1200 rpm durante 10 min, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 1 ml de RPMI completo (10% soro fetal bovino). Posteriormente as células foram contadas na câmara de *Neubauer* e a concentração celular foi ajustada para serem feitas as marcações de superfície e intracelulares com anticorpos monoclonais.

3.9 Imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias do baço e linfonodos pancreáticos

Alíquotas de 100 µl de suspensão celular, contendo 2×10^6 células/ml, foram incubadas com 100 µl de *Fc Block* por 20 minutos a temperatura ambiente, para minimizar a possibilidade de ligação inespecífica dos anticorpos. Após esse período, as amostras foram incubadas por 20 minutos a TA no escuro com 1µl de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou (PercP)), adquiridos da Becton-Dickinson (BD) ou Pharmingen. Foram feitas marcações duplas ou triplas para a análise de diversas subpopulações linfocitárias. Todas as incubações foram realizadas no escuro para evitar perda de fluorescência. As células

foram centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm, lavadas com PBS, ressuspensas em 200 µl de PBS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSsort (FACS Calibur, Cell Quest; BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Para marcação intracelular (Foxp3 e CTLA-4), após marcação com os anticorpos contra os antígenos de superfície, fixação (*FACS lysing solution*, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) e lavagens, as células foram permeabilizadas por 10 minutos a TA com 500 µl de solução de permeabilização (*FACS permeabilizing solution*, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) e então incubadas com o anticorpo monoclonal contra a proteína intracelular ou isotipo controle intracelular, por 30 minutos a TA. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS, e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo.

As seguintes subpopulações linfocitárias foram analisadas: CD3⁺CD4⁺ (linfócitos T *helper* ou auxiliares), CD3⁺CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos), CD3⁺CD4⁺CD26⁺ (linfócitos T *helper* ou auxiliares positivos para CD26), CD3⁺CD8⁺CD26⁺ (linfócitos T citotóxicos positivos para CD26), CD25⁺CD26⁺/CD69⁺CD26⁺ (linfócitos T ativados expressando CD26), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ (células T reguladoras positivas para Foxp3), CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺/CD4⁺CD25^{hi}CTLA4⁺ (células T reguladoras positivas para CTLA-4) e macrófagos (CD11b⁺). Controles isotípicos (IgG₁-FITC, IgG_{2a}-PE e IgG₁-PercP) foram incluídos em todos os experimentos para determinação de marcação inespecífica.

Após a aquisição das células foi realizada uma *gate* na população de linfócitos (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por parâmetros de granularidade (SSC). Para marcação de células T reguladoras foram adquiridos 100.000 eventos por amostra. Para as demais marcações extracelulares foram adquiridos 20.000 eventos por amostra. As análises foram realizadas utilizando-se o FACS Calibur (FACS Calibur, Cell Quest; BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Uma análise representativa das subpopulações de células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} positivas para CTLA-4 e Foxp3 está mostrada no Anexo (Figura I).

3.10 Obtenção do soro

Os camundongos foram anestesiados via intramuscular com ketamina (0,5 mg/10g de peso do animal) e xilasina (0,3 mg/10g de peso do animal) e cerca de 1 ml de sangue foi coletado através do plexo orbital com o auxílio de um capilar de vidro. O sangue foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos, a 4°C, e o soro (aproximadamente 300 µL) coletado e congelado a -20°C para os futuros ensaios de ELISA.

3.11 Dosagens hormonais séricas

O soro foi descongelado e ao retornar a temperatura ambiente foi coletado para quantificação dos hormônios glucagon (Alpco Diagnostics, Salem, NH,USA), GLP-1 ativo e insulina (Shibayagi Co., Ltd. Japan) por kits de ELISA comerciais, segundo as instruções do fabricante.

3.12 Coleta do pâncreas para análises histológicas

Após a eutanásia dos animais, os camundongos diabéticos tratados e diabéticos não tratados tiveram a remoção cirúrgica do pâncreas. Aproximadamente metade de cada pâncreas foi envolvido por papel filtro, fixado em solução tamponada de formaldeído 10% e mantido a temperatura ambiente para posterior inclusão na parafina, realização de reações de coloração por hematoxilina/eosina e reações de imunohistoquímica.

3.13 Análises histológicas do pâncreas

Aproximadamente metade de cada pâncreas foi envolvido por papel filtro, fixado em solução tamponada de formaldeído 10% e mantido a temperatura ambiente para posterior inclusão na parafina. Após inclusão na parafina, o material foi cortado a uma espessura de 5 μ m e as lâminas foram montadas, os cortes foram corados por hematoxilina e eosina para realização de análises histológicas no microscópio óptico.

3.14 Reações de imunohistoquímica do pâncreas

Para realização de imunohistoquímica, as lâminas foram tratadas com Poli-L-Lisina (Sigma) na diluição 1:10 antes de receber os cortes parafinados. O material foi cortado a uma espessura de 5 μ m, as lâminas foram montadas e as mesmas foram mantidas em forno seco a 60°C por 12 horas para melhor adesão do corte a lâmina. O material foi desparafinado e hidratado em uma bateria de xilol, álcool e água. Em seguida, foi iniciada a reação de imunohistoquímica com bloqueio da peroxidase endógena através do reagente Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO, Cytomation, Fort Collins, CO). Após o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas PBS+BSA 1% durante 20 minutos. Foi utilizado o anticorpo primário anti-insulina murina produzido em coelho, em

uma diluição de 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e o anticorpo primário anti-glucagon murina produzido em coelho, em uma diluição de 1:50 (Abcam, Cambridge, MA, USA). O kit Universal LSAB™+ Kit/HRP (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO) foi usado posteriormente como anticorpo secundário e estreptavidina. A reação foi revelada com DAB (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO) e contracorada com hematoxilina de Harris. As lâminas foram observadas sob microscópio óptico.

3.15 Contagem de ilhotas pancreáticas

Após a realização de reações de imunohistoquímica para insulina, foram escolhidos aleatoriamente 4 animais tratados e 4 animais não tratados com MK0431 após 30 e 90 dias de tratamento. Para os animais controles selvagens (WT) foram utilizados 2 animais. Para cada animal foram analisadas 3 lâminas contendo 3 cortes histológicos cada. Dentro da mesma lâmina, os cortes foram espaçados de 25-35 µm entre cada um deles. Totalizando 9 cortes diferentes para cada animal diabético tratado, não tratado e WT. Cada corte teve sua extensão varrida por inteiro para a realização da contagem das ilhotas pancreáticas positivas para marcação de insulina.

3.16 Coleta e congelamento do pâncreas para dosagem de citocinas no homogenato pancreático

Após a eutanásia dos animais, camundongos diabéticos tratados e diabéticos não tratados tiveram a remoção cirúrgica do pâncreas. Aproximadamente metade de cada pâncreas foi pesado e congelado a -20°C na presença de 700 µL de inibidor de proteases (Roche Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) para futura quantificação de citocinas por ELISA.

3.17 Dosagem de citocinas no homogenato pancreático

O material contido no inibidor de protease (Roche Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) foi descongelado e triturado com o auxílio do Politron (Brinkmann Instruments Inc, Westbury, NY, USA) para obtenção do homogenato pancreático. Após ser triturado, o homogenato foi centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi coletado para quantificação das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10 e IL-17 (eBioscience, San Diego, CA, USA).

4. Análise de dados

Foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) ou teste *t-Student* para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p valor for menor que 5% ($p < 0,05$). Esses testes foram realizados pelo programa estatístico GraphPad Prism (Graph Pad®, USA).

5. Resultados

5.1 Administração de inibidor de DPP-4 (MK0431) via gavagem durante 30 dias

5.1.1 Avaliação de peso corporal e glicemia

Após jejum de 12 horas, o diabetes foi induzido em camundongos C57Bl/6 machos, com 8 semanas de idade, através da administração intraperitoneal de 5 doses (42 mg/kg) diárias e consecutivas de estreptozotocina. Os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glicemia estavam acima de 250 mg/dL, por mais de duas medições consecutivas pela manhã (não-jejum).

Os animais foram tratados duas vezes ao dia (9:00h e 16:00h) via gavagem com inibidor de DPP-4 (MK043; iDPP-4) e devidamente divididos em subgrupos. O grupo G100 (n=5) recebeu durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias de 100mg/Kg de animal de iDPP-4. O grupo G200 (n=5) recebeu durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias de 200mg/Kg de animal de iDPP-4 via gavagem. O grupo G300 (n=5) recebeu durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias de 300mg/Kg de animal de iDPP-4 via gavagem. E por fim, grupo não tratado (n=6), caracterizado pelos animais diabéticos não tratados.

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente. Ao serem considerados diabéticos e 3 dias antes do início do tratamento (dia -3) com MK0431 via oral, os animais dos grupos G100, G200 e G300 apresentaram média de peso de 23.06 ± 0.04 g, 21.68 ± 0.05 g e de 23.46 ± 0.08 g de peso corporal, respectivamente. Embora esta diferença entre os pesos seja significativa ($p < 0,05$) anteriormente ao início do tratamento (dia -3), a mesma não foi relevante para os próximos dias, já que 7 dias após o início do tratamento os animais diabéticos não tratados apresentaram uma média de 22.50 ± 0.67 g e os animais tratados G100, G200 e G300 apresentaram uma média de 22.80 ± 0.25 g, 20.92 ± 0.30 g e 23.02 ± 0.15 g, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre animais tratados e não tratados.

Sete e 15 dias após o tratamento via gavagem, a dose administrada aos animais tratados com 100 e 300 mg/kg de MK0431 apresentaram-se como doses interessantes para a contenção de perda de peso corpóreo (22.80 ± 0.25 g e 23.02 ± 0.15 g, respectivamente) em relação ao grupo tratados com 200mg/Kg (20.92 ± 0.30 g) . Mas de uma forma geral, o tratamento com inibidores de DPP-4 não foi capaz de alterar o peso corporal dos animais tratados em relação aos animais diabéticos não tratados (Figura 1).

A glicemia basal dos animais foi avaliada semanalmente pela manhã (não jejum). Para tanto, utilizando-se um glicosímetro *Accu-Check Active* (Roche). Uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal e a taxa de glicose foi avaliada. Ao final dos 30 dias de tratamento com MK0431 via gavagem os níveis glicêmicos do grupo dos animais diabéticos não tratados apresentaram uma média 547.6 ± 22.85 mg/dL enquanto os grupos tratados G100, G200 e G300 apresentaram uma média 463.8 ± 44.87 , 471.8 ± 59.03 e 453.2 ± 36.62 , respectivamente, não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 2).

Foi realizada uma curva glicêmica (sem estímulo com glicose exógena) para o acompanhamento dos níveis de glicose decorrente da administração de MK0431 após 15 dias de tratamento. Após a dosagem da glicemia basal dos animais no tempo zero, os grupos tratados receberam a dose diária de MK0431 via gavagem (9:00h) e então a curva glicêmica foi acompanhada 30, 90, 150 e 270 minutos após a administração do medicamento. Noventa minutos após a administração do medicamento, os animais do grupo diabéticos não tratados apresentaram 528.0 ± 25.50 mg/dL de glicemia, enquanto os grupos G100, G200 e G300 obtiveram 376.3 ± 9.68 , 347.7 ± 32.90 e 362.7 ± 22.18 mg/dL de médias glicêmicas, respectivamente. Assim, os animais que receberam o tratamento conseguiram diminuir os níveis glicêmicos no tempo de 90 minutos quando comparado com animais diabéticos não tratados, sendo esta diferença estatisticamente significativa ao comparar os três grupos individualmente, G100, G200 e G300 em relação ao grupo não tratado ($p < 0,05$) (Figura 3).

Figura 1. Evolução do peso corporal durante o tratamento com inibidor de DPP-4 via gavagem. Os grupos G100, G200 e grupo G300 receberam durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias oral (9:00h e 16:00h) de 100, 200 e 300mg/Kg MK0431, respectivamente. O grupo diabético não tratado, caracterizado pelos animais diabéticos, não recebeu nenhum tipo de tratamento. A seta indica o início do tratamento (dia zero) com MK0431. # $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados e * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Figura 2. Evolução da glicemia basal durante 30 dias de tratamento com inibidor de DPP-4 via gavagem. Os grupos G100, G200 e G300 receberam durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias oral (9:00h e 16:00h) de 100, 200 e 300mg/Kg MK0431, respectivamente. O grupo diabético não tratado, caracterizado pelos animais diabéticos, não recebeu nenhum tipo de tratamento. A seta indica o início do tratamento (dia zero) com MK0431. A glicemia basal dos animais foi avaliada semanalmente pela manhã (não jejum) antes da administração de MK0431 as 9:00h.

Figura 3. Acompanhamento da glicemia basal após estímulo com inibidor de DPP-4 via gavagem. Os grupos G100, G200 e G300 receberam durante 15 dias consecutivos 2 doses diárias oral (9:00h e 16:00h) de 100, 200 e 300mg/Kg MK0431, respectivamente. O grupo diabético não tratado, caracterizado pelos animais diabéticos, não recebeu nenhum tipo de tratamento. A seta indica a administração de MK0431 via gavagem. Os animais foram seguidos até 270 minutos após a administração de MK0431. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.1.2 Dosagens hormonais séricas

Os inibidores de DPP-4 demonstraram eficiência terapêutica e segurança no tratamento de pacientes com diabetes mellitus através do aumento da biodisponibilidade de GLP-1 no organismo. Desse modo, utilizamos o tratamento com MK0431 com objetivo de aumentar os níveis de GLP-1 nos animais e melhorar os sintomas da doença através de seus efeitos antidiabéticos.

Ao final dos 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Posteriormente foram avaliados em relação aos padrões endocrinológicos. A concentração de GLP-1 ativo encontrada no soro dos animais diabéticos tratados G100, G200 e G300 foi de 33.91 ± 7.72 , 28.34 ± 6.69 e de 30.72 ± 4.85 pg/mL, respectivamente, foi significativamente maior do que nos animais diabéticos não tratados (7.42 ± 1.96 pg/mL) ($p < 0,05$) (Figura 4).

Uma das ações do hormônio GLP-1 é diminuir a secreção do glucagon. Desse modo, avaliamos também concentração sérica de glucagon por ELISA. A concentração de glucagon nos soros dos animais diabéticos tratados dos grupos G100, G200 e G300 foi de 540 ± 111.5 , 333 ± 76.71 e 459.8 ± 95.6 pg/ml, respectivamente. O grupo diabético não tratado apresentou uma concentração de 746 ± 52.21 pg/mL de glucagon. Sendo assim, somente os grupos tratados G200 e G300 obtiveram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da concentração de glucagon no soro em relação ao grupo dos animais que não receberam nenhum tipo de tratamento (Figura 4).

Figura 4. Dosagens de GLP-1 ativo (A) e glucagon (B) no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4, após 30 dias de tratamento. Os grupos G100, G200 e G300 receberam durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias oral (9:00h e 16:00h) de 100, 200 e 300mg/Kg MK0431, respectivamente. O grupo diabético não tratado, caracterizado pelos animais diabéticos, não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após o término do tratamento com MK0431, os animais tiveram amostras de sangue coletadas e centrifugadas para obtenção do soro. Os hormônios foram quantificados através de ELISA. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Além da dosagem de GLP-1 e glucagon, foi quantificada a concentração de insulina no soro dos animais (Figura 5). A concentração de insulina no soro dos animais diabéticos tratados dos grupos G100, G200 e G300 foi de 404.1 ± 54.16 , 336.8 ± 51.20 e 392.0 ± 129.6 pg/ml, respectivamente. O grupo diabético não tratado apresentou uma concentração de 268.9 ± 24.14 pg/ml de insulina. Embora os três grupos tratados tenham apresentado um aumento na concentração de insulina sérica, somente o grupo G100 demonstrou um aumento estatisticamente significativo (Figura 5).

Figura 5. Dosagens de insulina no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4, após 30 dias de tratamento. Os grupos G100, G200 e G300 receberam durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias oral (9:00h e 16:00h) de 100, 200 e 300mg/Kg MK0431, respectivamente. O grupo diabético não tratado, caracterizado pelos animais diabéticos, não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após o término do tratamento com MK0431, os animais tiveram amostras de sangue coletadas e centrifugadas para obtenção do soro. Os hormônios foram quantificados através de ELISA. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.1.3 Análise das subpopulações de células T reguladoras no baço e linfonodos pancreáticos

Ao final dos 30 dias de tratamento com inibidor de DPP-4 via gavagem os animais foram eutanasiados e tiveram baço e linfonodos pancreáticos coletados. Após a coleta os órgãos foram processados para imunofenotipagem. As subpopulações de células T $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{hi}$ positivas para o fator de transcrição Foxp3 foram quantificadas. Em relação à porcentagem de células $TCD4^+CD25^+Foxp3^+$ do baço não houve diferença entre os animais do grupo diabético não tratado e dos grupos tratados. Os animais diabéticos não tratados apresentaram $0.95 \pm 0.15\%$ de células $TCD4^+CD25^+Foxp3^+$, enquanto os grupos tratados G100, G200 e G300 apresentaram 1.0 ± 0.23 , 1.49 ± 0.27 e $0.70 \pm 0.13\%$ de células $TCD4^+CD25^+Foxp3^+$, respectivamente (Figura 6). Quanto a porcentagem de células $TCD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ observou-se uma tendência de aumento da porcentagem deste tipo celular nos grupos G200 e G300, em relação ao grupo diabético não tratado. Os grupos G100, G200 e G300 apresentaram na população celular do baço 0.09 ± 0.02 , 0.24 ± 0.08 e $0.25 \pm 0.09\%$ de células $TCD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$, respectivamente. O grupo diabético não tratado apresentou $0.08 \pm 0.02\%$ $TCD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ (Figura 6).

Figura 6. Frequência de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4, após 30 dias de tratamento. Os grupos G100, G200 e G300 receberam durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias oral (9:00h e 16:00h) de 100, 200 e 300mg/Kg MK0431, respectivamente. O grupo diabético não tratado, caracterizado pelos animais diabéticos, não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após o término do tratamento com MK0431, os animais tiveram seus baços coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Em relação à porcentagem de células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nos linfonodos pancreáticos, não houve diferença significativa entre o grupo diabético não tratado e os grupos tratados. Os animais diabéticos não tratados apresentaram $2.89 \pm 1.41\%$ de células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ enquanto os animais tratados dos grupos G100, G200 e G300 apresentaram 1.66 ± 0.28 , 3.19 ± 0.41 e $1.92 \pm 0.57\%$ células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Em relação à porcentagem de células TCD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺, assim como no baço, observou-se uma tendência de aumento da porcentagem deste tipo celular entre os grupos G200 e G300, em relação ao grupo diabético não tratado. Os grupos G100, G200 e G300 apresentaram 0.24 ± 0.01 , 0.63 ± 0.14 e $0.91 \pm 0.25\%$ de células TCD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ nos linfonodos pancreáticos, respectivamente, enquanto o grupo diabético não tratado apresentou $0.56 \pm 0.25\%$ desse subtipo celular (Figura 7).

Figura 7. Frequência de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4, após 30 dias de tratamento. Os grupos G100, G200 e G300 receberam durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias oral (9:00h e 16:00h) de 100, 200 e 300mg/Kg MK0431, respectivamente. O grupo diabético não tratado, caracterizado pelos animais diabéticos, não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após o término do tratamento com MK0431, os animais tiveram seus linfonodos pancreáticos coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

5.2 Administração de inibidor de DPP-4 (MK0431) incorporado a ração durante 30 e 90 dias

5.2.1 Análise da quantidade de ração/MK0431 consumida pelos animais

Após serem considerados diabéticos os animais foram divididos em dois grupos. O grupo dos animais diabéticos tratados receberam dieta contendo iDPP-4 (4g MK0431/Kg de ração) (n=6) *ad libitum* e o grupo controle composto pelos animais diabéticos não tratados, que receberam dieta controle sem nenhum tipo de tratamento (n=6). Os animais tratados foram subdivididos em 2 caixas, as quais receberam o mesmo tratamento (Caixa 1 e Caixa 2). Semanalmente foi analisada a quantidade de ração consumida pelos grupos, visto que entre uma caixa e outra os animais poderiam ingerir quantidades diferentes de inibidor de DPP-4. Ao final dos 30 dias de tratamento os animais diabéticos tratados ingeriram uma média de 6.78 ± 1.14 g de ração, correspondentes a uma média de 27.13 ± 4.56 mg de inibidor de DPP-4 por dia e por animal. Enquanto os animais tratados durante 90 dias ingeriram uma média de ração de 10.65 ± 0.85 g, correspondendo a 42,61 mg de inibidor de DPP-44 por dia e por animal. Apesar da maior ingestão de ração (g/24h) pelos animais tratados por 90 dias, esta diferença não foi estatisticamente significativa entre os animais tratados durante 30 e 90 dias (Figura 8).

Figura 8. Análise da ingestão de ração (A) e inibidor de DPP-4 (B) entre as caixas dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento (4g MK0431/Kg de ração). Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum* (Diabéticos+iDPP4 nas caixas 1 e 2).

5.2.2 Avaliação do peso corporal e glicemia

O peso corporal dos animais tratados ou não com o iDPP-4 foi avaliado semanalmente. Os animais diabéticos tratados apresentaram na primeira semana de tratamento um peso corporal de 22.75 ± 0.54 g, enquanto os animais diabéticos não tratados 21.64 ± 0.37 g. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no peso corporal durante os 30 dias de tratamento. Ao final dos 30 dias de tratamento os animais tratados apresentaram 21.46 ± 1.05 g, enquanto os animais diabéticos não tratados, 20.88 ± 0.70 g (Figura 9).

A glicemia basal (não jejum) também foi avaliada semanalmente. Os animais diabéticos que recebiam a ração contendo o iDPP-4 no início do tratamento (7 dias) apresentaram uma média glicêmica de 335.8 ± 28.20 mg/dL. Os animais diabéticos não tratados neste mesmo período apresentaram uma média de 326.0 ± 25.61 mg/dL de glicemia basal. Ao final dos 30 dias de de tratamento não foi observado diferenças significativas na taxa glicêmica dos animais diabéticos tratados (435.3 ± 68.0 mg/dL) em relação aos animais diabéticos não tratados (552.3 ± 39.47 mg/dL) (Figura 10.A).

Embora os níveis glicêmicos avaliados na ausência de jejum não apresentaram diferenças significativas, a glicemia de jejum apresentou-se diminuída nos animais diabéticos tratados com o iDPP-4 (Figura 10.B). Os animais diabéticos não tratados apresentaram 414.8 ± 38.02 mg/dL de glicemia de jejum, enquanto os animais diabéticos que receberam a ração contendo o iDPP-4 apresentaram uma média glicêmica de 265.5 ± 30.17 mg/dL.

Figura 9. Evolução do peso corporal dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum* durante 30 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. O peso dos animais foi avaliado semanalmente pela manhã (não jejum) durante 4 semanas.

Figura 10. Evolução da glicemia dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum* durante 30 dias de tratamento. A. Glicemia não jejum. B. Glicemia de jejum. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. A glicemia basal foi avaliada semanalmente pela manhã (não jejum) durante 4 semanas. A glicemia de jejum foi avaliada após o término do tratamento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Figura 11. Evolução do peso corporal dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum* durante 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. O peso dos animais foi avaliado semanalmente pela manhã (não jejum) durante 12 semanas.

A média do peso dos animais diabéticos tratados ao final dos 90 dias de tratamento foi aparentemente maior (23.18 ± 0.63 g) ao ser comparada com as animais diabéticos não-tratados (21.12 ± 1.25 g), indicando que o uso de inibidores de DPP-4 no modelo de diabetes tipo 1 quimicamente induzido pode evitar a perda de peso que causada pela doença (Figura 11).

Figura 12. Evolução da glicemia dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum* durante 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, foi os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. A glicemia basal foi avaliada semanalmente pela manhã (não jejum) durante 12 semanas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Ao final dos 90 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados com ração contendo o iDPP-4 apresentaram uma média glicêmica de 369.7 ± 60.69 mg/dL, enquanto os animais diabéticos não-tratados apresentaram uma média glicêmica de 582.7 ± 13.33 mg/dL (Tabela 1). Esses resultados sugerem que uso do inibidor de DPP-4 consegue reduzir os níveis glicêmicos somente a partir de um tratamento a longo prazo (Figura 12). A partir do 78º dia de tratamento a redução da glicemia dos animais diabéticos tratados foi estatisticamente significativa.

Tabela 1. Evolução temporal da glicemia dos camundongos diabéticos não tratados e tratados pela dieta contendo o inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum* após 90 dias de tratamento.

Dias	Diabéticos (mg/dL)	Diabéticos+iDPP4 (mg/dL)	p valor
0	293.0 ± 14.73	312.7 ± 17.85	0,4434
4	300.2 ± 17.07	338.3 ± 28.01	0,2716
15	596.7 ± 3.333	487.8 ± 38.78	0,0189*
23	566.7 ± 21.08	457.0 ± 37.28	0,0283*
32	494.0 ± 41.98	423.0 ± 63.42	0,3726
40	516.3 ± 43.07	422.5 ± 62.31	0,3022
47	580.0 ± 20.00	434.8 ± 60.12	0,0351*
54	567.7 ± 27.64	459.5 ± 57.35	0,1202
60	473.0 ± 19.47	476.7 ± 61.44	0,9689
67	543.2 ± 27.03	401.2 ± 70.06	0,0879
78	605.5 ± 4.485	353.0 ± 46.61	0,0003*
90	582.7 ± 13.33	369.7 ± 60.69	0,0065*

Após serem considerados diabéticos, os animais dieta controle (AIN-93M Purificada, n=6) ou dieta contendo o iDPP-4 durante 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada, n=6) *ad libitum*. A glicemia basal e o peso dos animais foram avaliados semanalmente pela manhã (não jejum) durante 12 semanas. Os valores acima representam a média glicêmica, + ou – desvio padrão. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.2.3 Teste de tolerância oral a glicose

Decorridos 15, 30 e 90 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose (TTOG). Após 12 horas de jejum, foi realizado o TTOG nos animais diabéticos tratados ou não, bem como em animais saudáveis (WT-selvagens). A solução de glicose foi administrada via gavagem (oral) na concentração de 1,5 mg por grama de animal. A glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, e aos 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração desta. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal nos determinados períodos de tempo e a taxa de glicose foi avaliada através do glicosímetro *Accu-Check Active* (Roche).

Após 15 dias do início do tratamento, ao ser realizado o TTOG, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da taxa glicêmica somente no período de 15 minutos ao comparado com os animais diabéticos não tratados. Os animais diabéticos não tratados no tempo de 15 minutos após o desafio com a glicose oral apresentaram uma média glicêmica de 568.5 ± 3.5 mg/dL, já os animais diabéticos tratados apresentaram uma média glicêmica de 445.3 ± 19 mg/dL (Figura 13). Aos 30 dias de tratamento observou-se uma diferença estatisticamente significativa da taxa glicêmica somente no período de 180 minutos ao comparado com os animais diabéticos não tratados. Os animais diabéticos não tratados no tempo de 180 minutos após o desafio com a glicose oral apresentaram uma média glicêmica de 306.6 ± 25.76 mg/dL, enquanto os animais tratados apresentaram uma média glicêmica de 163.4 ± 39.65 mg/dL (Figura 14).

O resultado mais expressivo foi observado ao final dos 90 dias de tratamento (Figura 15) com o iDDP-4. Nesse período, os animais diabéticos tratados apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de glicose em todos os tempos analisados no desafio oral (Tabela 2).

Figura 13. Teste de tolerância oral a glicose após 15 dias de tratamento com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*. Ao término do tratamento e após 12 horas de jejum, uma solução de glicose (1,5 mg/g animal) foi administrada via gavagem (oral) e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração desta. Animais diabéticos: animais diabéticos tratados com dieta controle (AIN-93M Purificada) durante 15 dias *ad libitum*. Animais diabéticos+iDPP4: animais diabéticos tratados com dieta contendo MK0431 durante 15 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Animais WT : animais selvagens tratados com dieta controle (AIN-93M Purificada) durante 15 dias *ad libitum*. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Figura 14. Teste de tolerância oral a glicose após 30 dias de tratamento com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*. Ao término do tratamento e após 12 horas de jejum, uma solução de glicose (1,5 mg/g animal) foi administrada via gavagem (oral) e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração desta. Animais diabéticos: animais diabéticos alimentados com dieta controle (AIN-93M Purificada) durante 30 dias *ad libitum*. Animais diabéticos+iDPP4: animais diabéticos tratados com dieta contendo MK0431 durante 30 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Animais WT : animais selvagens tratados com dieta controle (AIN-93M Purificada) durante 30 dias *ad libitum*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Figura 15. Teste de tolerância oral a glicose após 90 dias de tratamento com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*. Ao término do tratamento e após 12 horas de jejum, uma solução de glicose (1,5 mg/g animal) foi administrada via gavagem (oral) e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração desta. Animais diabéticos: animais diabéticos tratados com dieta controle (AIN-93M Purificada) durante 90 dias *ad libitum*. Animais diabéticos+iDPP4: animais diabéticos tratados com dieta contendo MK0431 durante 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Animais WT : animais selvagens tratados com dieta controle (AIN-93M Purificada) durante 90 dias *ad libitum*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Tabela 2. Teste de tolerância oral a glicose dos camundongos diabéticos não tratados e tratados pela dieta contendo o inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum* após 90 dias de tratamento.

Tempo (min)	Diabéticos (mg/dL)	Diabéticos+iDPP4 (mg/dL)	p valor
0	325.7 ± 12.98	234.8 ± 27.88	0,0145*
15	593.2 ± 9.027	487.0 ± 29.67	0,0065*
30	578.7 ± 14.05	467.3 ± 29.28	0,0065*
60	544.8 ± 21.11	402.2 ± 30.30	0,0031*
120	412.2 ± 11.39	291.2 ± 37.69	0,0118*
180	364.0 ± 9.338	233.5 ± 37.59	0,0071*

Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada, n=6) ou dieta contendo o iDPP-4 durante 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada, n=6) *ad libitum*. Ao final do tratamento e após 12 horas de jejum, foi realizado o teste de tolerância oral à glicose nos animais diabéticos tratados ou não. A solução de glicose foi administrada via gavagem (oral) na concentração de 1,5 mg por grama de animal e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração desta. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal nos determinados períodos de tempo e a taxa de glicose foi avaliada através do glicosímetro Accu-Check Active (Roche). Os valores acima representam a média glicêmica + ou – desvio padrão. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.2.4 Dosagens hormonais séricas

5.2.4.1 Dosagem de GLP-1 ativo

Após 30 ou 90 dias de tratamento, os camundongos foram anestesiados e o sangue foi coletado através do plexo orbital. Após 30 dias de tratamento, animais diabéticos não tratados apresentaram 7.42 ± 1.96 pg/mL (média ± desvio padrão) de GLP-1 ativo sérico, enquanto os animais diabéticos tratados apresentaram um aumento significativo da concentração do hormônio (52.83 ± 3.52 pg/mL, $p<0,05$) (Figura 16.A). Foi observado também um aumento significativo de GLP-1 no soro dos animais que receberam a ração contendo o iDDP-4, quando comparados aos animais que receberam a droga via oral duas vezes ao dia. Conforme já descrito anteriormente, os animais que receberam iDPP-4 incorporado à ração apresentaram 52.83 ± 3.52 pg/mL de GLP-1 ativo no soro, enquanto que os grupos que receberam o medicamento via gavagem G100, G200 e G300 apresentaram 33.91 ± 7.72 , 28.34 ± 6.69 e 30.72 ± 4.85 pg/mL, respectivamente (Figura 16.B). Após 90 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados apresentaram 37.02 ± 11.02

pg/mL de GLP-1 ativo no soro. Embora tenha sido observado um aumento significativo de GLP-1 nos animais diabéticos tratados em relação aos não tratados, não houve diferença significativa na concentração de GLP-1 no soro entre os animais diabéticos tratados durante 30 dias (52.83 ± 3.52 pg/mL) e os animais diabéticos tratados durante 90 dias (37.02 ± 11.02 pg/mL) (Figura 17).

Figura 16. Dosagem de GLP-1 ativo no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 após 30 de tratamento. **A.** Dosagem de GLP-1 ativo no soro dos animais diabéticos tratados e não tratados com iDDP-4 incorporado à ração (4g MK0431/Kg de ração) *ad libitum*, após o término do tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo diabético. **B.** Dosagem de GLP-1 ativo no soro dos animais tratados com iDDP-4 incorporados na ração (4g MK0431/Kg de ração) *ad libitum* e dos animais tratados com iDDP-4 via gavagem, após o término do tratamento. Os grupos G100 (n=5), G200 (n=5) e grupo G300 (n=5) receberam durante 30 dias consecutivos 2 doses diárias oral (9:00h e 16:00h) de 100, 200 e 300mg/Kg MK0431, respectivamente. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais tiveram amostras de sangue coletadas e centrifugadas para obtenção do soro. O hormônio GLP-1 foi quantificado por ELISA. * $p < 0,05$ em relação aos grupos G100, G200 e G300.

Figura 17. Dosagem de GLP-1 ativo no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo iDDP-4 durante 30 ou 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com MK0431, os animais tiveram amostras de sangue coletadas e centrifugadas para obtenção do soro. O hormônio GLP-1 foi quantificado por ELISA. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.2.4.2 Dosagem de insulina

A insulina foi quantificada no soro dos animais após 30 e 90 dias de tratamento com iDPP-4. Não houve diferenças significativas nos níveis séricos de insulina nos animais diabéticos tratados em relação aos não tratados, após 30 dias de tratamento. Entretanto, após 90 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados apresentaram uma concentração sérica (2.073 ± 0.75 ug/mL) de insulina maior do que os animais não tratados (0.227 ± 0.114 ug/mL) (Figura 18).

Figura 18. Dosagem de insulina no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo iDDP-4 durante 30 ou 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com MK0431, os animais tiveram amostras de sangue coletadas e centrifugadas para obtenção do soro. O hormônio insulina foi quantificado por ELISA. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.2.4.3 Dosagem de glucagon

Após 30 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados e não tratados apresentaram uma concentração sérica de 69.00 ± 13.61 pg/mL e 94.50 ± 5.39 pg/mL de glucagon, respectivamente. Os níveis de glucagon, após 90 dias de tratamento com iDPP-4, foram de 80.40 ± 11.43 pg/mL nos animais diabéticos tratados e de 118.0 ± 32.05 pg/mL nos animais diabéticos não tratados. Os resultados mostraram uma tendência a diminuição dos níveis desse hormônio hiperglicemiante após tratamento prolongado com IDDP-4, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura19).

Figura 19. Dosagem de glucagon no soro dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo iDPP-4 durante 30 ou 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com MK0431, os animais tiveram amostras de sangue coletadas e centrifugadas para obtenção do soro. O hormônio glucagon foi quantificado por ELISA.

5.2.5 Análises das populações celulares

5.2.5.1 Imunofenotipagem das populações celulares do baço

O tratamento de animais diabéticos com análogos de GLP-1 foi associado com mudanças significativas no número de células do sistema imunológico em diferentes órgãos linfóides (Hadjiyanni *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2008). Portanto, a utilização de inibidores de DPP-4, o qual visa aumentar os níveis de GLP-1 circulante, poderia conseqüentemente alterar os padrões celulares nos animais tratados.

Baseado nesta hipótese, ao final dos 30 e 90 dias de tratamento os animais foram eutanasiados e tiveram seus baços, timos e linfonodos pancreáticos coletados e processados para imunofenotipagem das células. Foram analisadas as populações celulares que apresentassem dupla marcação para CD3 e CD4, para CD3 e CD8, e marcação para CD11b (Figura 20).

Figura 20. Frequência de células T CD3⁺CD4⁺, T CD3⁺CD8⁺ e de macrófagos CD11b⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento, os animais tiveram seus baços coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Figura 21. Frequência das populações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento, os animais tiveram seus baços coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Após 30 dias de tratamento, foi observado um aumento da porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺ no baço dos animais tratados com iDDP-4 ($16.39 \pm 0.56\%$) em relação aos animais não tratados ($13.86 \pm 0.66\%$). Após 90 dias de tratamento, a porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺ do baço dos animais tratados ou não com iDDP-4 foi $16.95 \pm 0.86\%$ e $19.13 \pm 0.75\%$, respectivamente (Figura 21). Assim, mesmo as diferenças não sendo significativas entre as animais tratados e não tratados após 90 dias de tratamento, aparentemente há uma

manutenção da frequência de células TCD3⁺CD4⁺ nos animais diabéticos tratados, enquanto que os animais diabéticos não tratados apresentaram um aumento significativo dessas células.

Figura 22. Frequência das populações de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento, os animais tiveram seus baços coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Em relação à porcentagem de células TCD3⁺CD8⁺ no baço dos animais diabéticos tratados com iDDP-4 por 30 dias, observou-se um aumento significativo dessas células (9.67 ± 0.52%) nos animais tratados em relação aos animais não tratados (7.22 ± 0.11%) (Figura 22). Após 90 dias de tratamento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Além disso, não houve diferença significativa na frequência de células CD11b⁺ entre os animais diabéticos tratados ou não com o iDDP-4 por 30 ou 90 dias (Figura 20).

O uso de inibidores de DPP-4, pelo aumento da concentração de GLP-1 (Xue *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2010), poderiam induzir um aumento na frequência de células Tregs (TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺) nos animais tratados. Após 30 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados apresentaram um aumento significativo da porcentagem de células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (1.064 ± 0.071%) em relação aos animais diabéticos não tratados (0.745 ± 0.099%) (Figura 23.A). A porcentagem de células TCD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ também aumentou nos animais diabéticos tratados (0.362 ± 0.069%) em relação aos animais diabéticos não tratados (0.189 ± 0.036%) (Figura 23.B). Após 90 dias de tratamento não foram observadas diferenças estatísticas significativas na porcentagem das subpopulações de células Tregs entre os grupos diabéticos tratados e não tratados.

Figura 23. Frequência das populações de linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (A) e T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ (B) no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento, os animais tiveram seus baços coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Figura 24. Frequência das populações de linfócitos T CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ (A) e T CD4⁺CD25^{hi}CTLA4⁺ (B) no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento, os animais tiveram seus baços coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

As subpopulações de células Tregs positivas para CTLA-4 também foram quantificadas por citometria de fluxo. Após 30 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados apresentaram $0.794 \pm 0.021\%$ de células TCD4⁺CD25⁺CTLA4⁺, enquanto os animais diabéticos não tratados apresentaram $0.772 \pm 0.049\%$ dessas células (Figura 24.A). Após 90 dias de tratamento, também não houve diferença estatística significativa entre a porcentagem de células TCD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ nos animais diabéticos tratados ($0.707 \pm 0.046\%$) em relação aos não tratados ($0.688 \pm 0.056\%$) (Figura 24.A). Resultados semelhantes foram observados para a subpopulação de células TCD4⁺CD25^{hi}CTLA4⁺ (Figura 24.B). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no mesmo período e entre os períodos (Figura 24.B).

Figura 25. Frequência das populações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD26⁺ (A) e T CD3⁺CD8⁺CD26⁺ (B) no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento, os animais tiveram seus baços coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Além da quantificação da frequência de células Tregs, também foram quantificadas a frequência de células T CD3⁺CD4⁺CD26⁺ e CD3⁺CD8⁺CD26⁺. Após 30 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados e não tratados não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺CD26⁺. No entanto, após 90 dias, a porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺CD26⁺ diminuiu significativamente nos animais tratados (10.50 ± 0.51%) em relação aos animais não tratados (14.81 ± 2.03%). Quanto à frequência das células TCD3⁺CD8⁺CD26⁺, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos períodos analisados (Figura 25.B). Em relação à porcentagem de células T CD4⁺CD26^{bright} e T CD8⁺CD26^{bright} (com alta expressão de CD26), também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos diferentes períodos de tratamento (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência das populações de linfócitos T CD4⁺CD26^{bright} e T CD8⁺CD26^{bright} no baço dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento.

Subtipo Celular	Dias de tratamento	Diabéticos (% células)	Diabéticos+iDPP4 (% células)	p valor
Células T CD4 ⁺ CD26 ^{bright}	30	0.467 ± 0.102	0.335 ± 0.050	0,2983
	90	6.834 ± 1.511	6.255 ± 0.532	0,7058
Células T CD8 ⁺ CD26 ^{bright}	30	1.579 ± 0.301	1.475 ± 0.284	0,8093
	90	5.632 ± 0.573	5.992 ± 0.538	0,6593

Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada, n=6) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada, n=6) *ad libitum*. Após o término do tratamento com iDPP-4, os animais tiveram seus baços coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os valores acima representam a média da porcentagem + ou - o desvio padrão.

5.2.5.2 Imunofenotipagem das populações celulares do timo

Não foram observadas diferenças significativas na frequência das populações de células T CD3⁺CD4⁺, T CD3⁺CD8⁺ e macrófagos CD11b⁺ encontradas no timo dos animais diabéticos tratados e não tratados, em ambos os períodos, 30 e 90 dias após o tratamento (Figura 26 e Tabela 4).

Figura 26. Frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ e de macrófagos CD11b⁺ no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDPP-4, os animais tiveram o timo coletado e processado para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Tabela 4. Frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ e de macrófagos CD11b⁺ no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento.

Subtipo Celular	Dias de tratamento	Diabéticos (% células)	Diabéticos+iDPP4 (% células)	p valor
Células T CD3 ⁺ CD4 ⁺	30	12.94 ± 0.832	14.24 ± 0.984	0,3521
	90	8.630 ± 0.791	7.668 ± 0.267	0,2767
Células T CD3 ⁺ CD8 ⁺	30	8.958 ± 0.425	9.605 ± 0.440	0,3314
	90	3.963 ± 0.581	4.083 ± 0.137	0,8449
Células CD11b ⁺	30	0.335 ± 0.133	0.117 ± 0.011	0,1569
	90	0.436 ± 0.145	0.126 ± 0.012	0,1123

Após serem considerados diabéticos, os animais receberam animais dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo o iDDP-4 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com iDPP-4, os animais tiveram o timo coletado e processado para imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os valores acima representam a média da porcentagem + ou – o desvio padrão. * p>0,05 entre animais diabéticos tratados e não tratados.

Além da análise das populações de células T auxiliares, T citotóxicas e dos macrófagos no timo, a frequência de células Tregs também foi avaliada. Após 30 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados apresentaram uma tendência de aumento na frequência de células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (1.326 ± 0.224%) em relação enquanto os animais diabéticos não tratados (0.701 ± 0.269%) (Figura 27.A). Além disso, a frequência de células TCD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ (alta expressão de CD25; 0.496 ± 0.083%), após 30 dias de tratamento, também uma tendência de aumento quando comparada a dos animais diabéticos não tratados (0.216 ± 0.102%) (Figura 27.B). Após 90 dias de tratamento, não foi observadas diferenças em ambas as populações de células Tregs entre os grupos diabéticos tratados e não tratados.

Figura 27. Frequência das populações de linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (A) e T CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ (B) no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais tiveram o timo coletado e processado para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Além das células Tregs positivas para Foxp3, as subpopulações de células TCD4⁺CD25⁺ e TCD4⁺CD25^{hi} positivas para CTLA-4 também foram quantificadas por citometria de fluxo. Após 30 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados apresentaram uma tendência de aumento da porcentagem de células TCD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ ($1.011 \pm 0.155\%$), em relação aos animais diabéticos não tratados ($0.826 \pm 0.107\%$), embora não seja estatisticamente significativa (Figura 28.A). Além disso, a frequência das células TCD4⁺CD25^{hi}CTLA4⁺ (alta expressão de CD25), após 30 dias de tratamento, também apresentou uma tendência de aumento ($0.531 \pm 0.039\%$) no timo dos animais diabéticos tratados em relação aos animais diabéticos não tratados ($0.432 \pm 0.049\%$) (Figura 28.B). Após 90 dias de tratamento, não foram observadas diferenças significativas na frequência de ambas as subpopulações de células Tregs positivas para CTLA-4 (Figura 28.A e B).

Figura 28. Frequência das populações de linfócitos T CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ (A) e T CD4⁺CD25^{hi}CTLA4⁺ (B) no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais tiveram o timo coletado e processado para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Após 30 e 90 dias de tratamento, os animais diabéticos tratados e não tratados não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺ e TCD3⁺CD8⁺ positivas para CD26 presentes no timo. Após 30 dias, a porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺CD26⁺ foi de $11.61 \pm 0.891\%$ nos animais diabéticos tratados e de $10.32 \pm 0.287\%$ nos animais não tratados. Após 90 dias, a porcentagem de células TCD3⁺CD4⁺CD26⁺ foi de $6.598 \pm 0.25\%$ nos animais diabéticos tratados e de $7.891 \pm 0.709\%$ nos animais não tratados (Figura 29.A). A frequência das células TCD3⁺CD8⁺CD26⁺, nos animais diabéticos tratados após 30 dias foi de $7.365 \pm 0.343\%$ e $6.905 \pm 0.365\%$, respectivamente, nos animais diabéticos tratados ou não tratados com o iDDP-4. Após 90 dias de tratamento, também não houve diferença entre a porcentagem de células TCD3⁺CD8⁺CD26⁺ nos animais diabéticos tratados ou não tratados (Figura 29.B).

A frequência das subpopulações de células T ativadas CD25⁺CD26^{bright} e CD69⁺CD26^{bright} também foi avaliada no timo dos animais diabéticos tratados ou não com o iDDP4, porém não foram observadas alterações significativas (Tabela 5).

Figura 29. Frequência das populações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD26⁺ (A) e T CD3⁺CD8⁺CD26⁺ (B) no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais tiveram o timo coletado e processado para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Tabela 5. Frequência de células T CD25⁺CD26^{bright} e T CD69⁺CD26^{bright} no timo dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento.

Subtipo Celular	Dias de tratamento	Diabéticos (% células)	Diabéticos+iDPP4 (% células)	p valor
Células T CD25 ⁺ CD26 ^{bright}	30	2.650 ± 0.524	2.948 ± 0.665	0,7460
	90	7.250 ± 0.250	3.520 ± 1.095	0,0865
Células T CD69 ⁺ CD26 ^{bright}	30	10.19 ± 2.120	9.210 ± 2.00	0,7536
	90	10.97 ± 1.02	8.383 ± 1.134	0,2264

Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo o iDDP-4 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais tiveram o timo coletado e processado para imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os valores acima representam a média da porcentagem + ou - o desvio padrão. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.2.5.3 Imunofenotipagem das populações celulares dos linfonodos pancreáticos

Devido ao número pequeno de células obtidas dos linfonodos pancreáticos dos animais tratados ou não com o iDDP-4, foi possível quantificar somente as células TCD3⁺CD4⁺, TCD3⁺CD8⁺ e CD11b⁺.

Após 30 dias de tratamento foi observada uma diminuição significativa na razão entre as porcentagens TCD3⁺CD4⁺ / TCD3⁺CD8⁺ nos animais diabéticos tratados (1.327 ± 0.057), em relação aos animais diabéticos não tratados (1.602 ± 0.039) (Figura 30). O mesmo foi observado após 90 dias de tratamento, embora essa diminuição tenha sido ainda mais evidente (Figura 30).

Figura 30. Razão entre as porcentagens de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ / T CD3⁺CD8⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais tiveram os linfonodos pancreáticos coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Também foi analisada a frequência da população de macrófagos CD11b⁺ nos linfonodos pancreáticos. Após 30 dias de tratamento, foi observada uma tendência de diminuição na porcentagem de macrófagos CD11b⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos tratados em relação aos não tratados. Após 90 dias de tratamento, houve uma diminuição significativa na porcentagem dessas células no linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos tratados (Tabela 6 e Figura 31).

Tabela 6. Frequência de macrófagos CD11b⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento.

Subtipo Celular	Dias de tratamento	Diabéticos (% células)	Diabéticos+iDPP4 (% células)	p valor
% Células	30	4.213 ± 0.243	3.158 ± 0.593	0,2083
CD11b ⁺	90	3.762 ± 0.512	2.283 ± 0.166	0,0158*

Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo o iDDP-4 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais tiveram o timo coletado e processado para imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os valores acima representam a média da porcentagem + ou - o desvio padrão. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Figura 31. Frequência de macrófagos CD11b⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais tiveram os linfonodos pancreáticos coletados e processados para imunofenotipagem por citometria de fluxo. *p<0,05 em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.2.6 Dosagem de citocinas presentes no homogenato pancreático

Foi realizada a quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-17 no homogenato pancreático dos animais diabéticos tratados ou não com o iDDP-4 por 30 ou 90 dias.

Em relação às citocinas inflamatórias, foi observada uma diminuição significativa da concentração de IFN- γ no homogenato pancreático dos animais diabéticos tratados, após 30 e 90 dias de tratamento, sugerindo um possível papel anti-inflamatório do iDDP-4 no microambiente pancreático (Figura 32 e Tabela 7).

Após 90 dias de tratamento com o iDDP-4, foi observada uma diminuição significativa de IL-10, IFN- γ e TNF- α no homogenato pancreático (Tabelas 7 e 8; Figuras 32 e 33). A concentração de IL-17 apresentou uma tendência a diminuição no homogenato pancreático dos animais tratados, embora não estatisticamente significativa (Figura 33).

Figura 32. Dosagem das citocinas IFN- γ e TNF- α no homogenato pancreático dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado a ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com iDDP-4, os animais tiveram o pâncreas coletado e processado na presença de inibidor de protease. As citocinas foram quantificadas através do método de ELISA e suas concentrações representadas pela razão de picograma de citocina por grama de tecido pancreático. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Tabela 7. Concentrações das citocinas IFN- γ e TNF- α no homogenato pancreático dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento.

Citocina	Dias de tratamento	Diabéticos (pg/g)	Diabéticos+iDPP4(pg/g)	p valor
IFN- γ	30	89.85 $\pm$ 24.79	20.64 $\pm$ 9.126	0,0076*
	90	256.2 $\pm$ 29.32	86.68 $\pm$ 15.13	0,0004*
TNF- α	30	1026 $\pm$ 311.4	556.2 $\pm$ 181.2	0,2217
	90	1610 $\pm$ 121.6	1038 $\pm$ 154.8	0,0157*

Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com iDDP-4, os animais tiveram o pâncreas coletado e processado na presença de inibidor de protease. As citocinas foram quantificadas através do método de ELISA e suas concentrações representadas pela razão de picograma de citocina por grama de tecido pancreático. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Figura 33. Dosagem das citocinas IL-10 e IL-17 no homogenato pancreático dos animais diabéticos tratados e não tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com iDDP-4, os animais tiveram o pâncreas coletado e processado na presença de inibidor de protease. As citocinas foram quantificadas através do método de ELISA e suas concentrações representadas pela razão de nanograma de citocina por grama de tecido pancreático. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Tabela 8. Concentrações das citocinas IL-10 e IL-17 no homogenato pancreático dos animais diabéticos não tratados e tratados com inibidor de DPP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento.

Citocina	Dias de tratamento	Diabéticos (ng/g)	Diabéticos+iDPP4(ng/g)	p valor
IL-10	30	49.99 $\pm$ 14.63	31.40 $\pm$ 4.360	0,2689
	90	22.74 $\pm$ 1.037	17.40 $\pm$ 1.842	0,0299*
IL-17	30	8.930 $\pm$ 2.317	6.085 $\pm$ 2.348	0,4322
	90	8.280 $\pm$ 0.411	6.328 $\pm$ 1.399	0,1483

Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 e 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com iDDP-4, os animais tiveram o pâncreas coletado e processado na presença de inibidor de protease. As citocinas foram quantificadas através do método de ELISA e suas concentrações representadas pela razão de nanograma de citocina por grama de tecido pancreático. * $p < 0,05$ em relação ao grupo dos animais diabéticos.

5.2.7 Análises histológicas

5.2.7.1 Análises histológicas dos animais controles selvagens

Os animais controles selvagens (WT) utilizados nos experimentos foram animais da linhagem C57BL/6 (machos com aproximadamente 10 semanas de idade). Após a eutanásia dos animais, foi realizada a remoção cirúrgica do pâncreas. Aproximadamente metade de cada pâncreas foi envolvido por papel filtro, fixado em solução tamponada de formaldeído 10% e mantido a temperatura ambiente para posterior inclusão na parafina, realização de reações de coloração por hematoxilina/eosina e reações de imunohistoquímica.

Através das análises histológicas (coloração com hematoxilina e eosina), foi possível observar a porção exócrina conservada caracterizada por uma estrutura acinosa íntegra, e a porção endócrina, caracterizada pelas ilhotas pancreáticas grandes, bem delimitadas e livres de qualquer tipo de destruição celular (Figura 34).

Figura 34. Análise histológica do pâncreas dos animais controles selvagens (WT). Animais C57BL/6 (machos com aproximadamente 10 semanas de idade) foram eutanasiados e submetidos a remoção cirúrgica do pâncreas. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em seções de 5μm, corado com hematoxilina-eosina e visualizado em microscópio óptico. A. Ilhotas pancreáticas de camundongo WT, apresentando morfologia arredondada típica e estrutura acinosa conservada (100X). B. Ilhota pancreática de camundongo WT (200X).

Os animais controles selvagens (WT) apresentaram número e tamanho normais de ilhotas pancreáticas, e células betas pancreáticas fortemente marcadas para insulina nas reações de imunohistoquímica, evidenciando um microambiente pancreático normal (Figura 35 e Tabela 7).

Além da marcação para insulina, foi avaliada a marcação de glucagon nas células alfa pancreáticas (Figura 36). Conforme esperado, as ilhotas pancreáticas apresentaram células beta marcadas para insulina na região central, e células alfa marcadas para glucagon localizadas mais periféricamente (Figuras 35 e 36).

Figura 35. Análise da massa de células beta produtoras de insulina dos animais controles selvagens (WT). Animais C57Bl/6 (machos com aproximadamente 10 semanas de idade) foram eutanasiados e submetidos a remoção cirúrgica do pâncreas. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em secções de 5µm, para realização da reações de imunohistoquímica para insulina e visualizado em microscópio óptico. A. Visão geral da estrutura acinosa e das ilhotas pancreáticas fortemente evidenciadas pela cor marrom da marcação para insulina (40X). B. Ilhotas pancreáticas fortemente marcadas para insulina (200X). C. Ilhota pancreática fortemente marcada para insulina (400X). D. Controle negativo da reação de imunohistoquímica (200X).

Figura 36. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon dos animais controles selvagens (WT). Animais C57Bl/6 (machos com aproximadamente 10 semanas de idade) foram eutanasiados e submetidos a remoção cirúrgica do pâncreas. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em secções de 5µm, para realização das reações de imunohistoquímica para glucagon e visualizado em microscópio óptico. A. Visão geral da estrutura acinosa e das ilhotas pancreáticas fortemente evidenciadas pelo tom marrom da marcação para glucagon (100X). B. Ilhotas pancreáticas fortemente marcadas para glucagon (200X). C. Ilhota pancreática fortemente marcada para glucagon (400X). D. Controle negativo da reação de imunohistoquímica (100X).

5.2.7.2 Análises histológicas dos animais diabéticos tratados e não tratados após 30 dias

Com objetivo de avaliar um possível papel do inibidor de DPP-4 na proteção da massa de células beta pancreáticas existentes ou na expansão das mesmas, foram avaliadas a morfologia das ilhotas pancreáticas e a quantidade de ilhotas positivas para insulina no tecido pancreático.

Através das análises histológicas (coloração com hematoxilina e eosina), foi possível observar nos animais diabéticos não tratados (Figura 37.A) e tratados (Figura 37.C) com inibidor de DPP-4 um leve comprometimento da estrutura e integridade dos ácinos, bem como uma diminuição do número das ilhotas pancreáticas (Figura 37 A e B, Tabela 7).

Ao contrário dos animais saudáveis (WT), os animais diabéticos tratados e não tratados apresentaram uma intensa perda de massa de células beta, com redistribuição de células alfa positivas para glucagon na região central das ilhotas pancreáticas (Figuras 38 e 39).

Após 30 dias de tratamento, os animais diabéticos não tratados apresentaram um número escasso de ilhotas pancreáticas marcadas para insulina. Encontramos uma grande dificuldade para a contagem das ilhotas pancreáticas nessas lâminas, que apresentavam tamanho diminuído e marcação escassa para insulina (Figura 38 A e B).

Já, os animais diabéticos tratados com o iDDP-4 por 30 dias (Figura 38 C e D), apesar da marcação menos intensa de insulina nas células beta, encontramos menor dificuldade para a contagem das ilhotas pancreáticas. Porém, o número de ilhotas entre os animais diabéticos não tratados e tratados por 30 dias não foi estatisticamente diferente (Tabela 9).

Os animais diabéticos não tratados e tratados por 30 dias apresentaram intensa marcação para glucagon em suas ilhotas. Aparentemente, em alguns dos cortes analisados foi possível observar uma discreta diminuição da marcação para glucagon nos animais diabéticos tratados (Figura 39.D), quando comparado com os animais diabéticos não tratados (Figura 39. B).

Figura 37. Análise histológica do pâncreas dos animais diabéticos não tratados (A e B) e tratados com inibidor de DPP-4 (C e D) incorporado à ração *ad libitum*, após 30 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais foram eutanasiados e tiveram o pâncreas coletado. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em secções de 5µm, corado com hematoxilina-eosina e visualizado em microscópio óptico. A. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4. Visão geral da estrutura pancreática, predominância da área acinosa e ausência de ilhotas pancreáticas (40X). B. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4 (100X). C. Animais diabéticos tratados com iDDP-4 por 30 dias, apresentando menor número de ilhotas pancreáticas com estrutura comprometida (40X). D. Animais diabéticos tratados com iDDP-4 por 30 dias apresentando ilhotas pancreáticas com estrutura comprometida (100X).

Figura 38. Análise da massa de células beta produtoras de insulina dos animais diabéticos não tratados (A e B) e tratados com inibidor de DPP-4 (C e D) incorporado à ração *ad libitum*, após 30 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais foram eutanasiados e tiveram o pâncreas coletado. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em secções de 5µm, para a realização da reação de imunohistoquímica para insulina e visualizado em microscópio óptico. A. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4. Visão geral da estrutura pancreática, predominância da área acinosa, ilhotas pancreáticas com escassa marcação para insulina (40X). B. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4 (200X). C. Animais diabéticos tratados com iDDP-4 por 30 dias apresentando menor número de ilhotas pancreáticas com estrutura comprometida (100X). D. Animais diabéticos tratados com iDDP-4 por 30 dias apresentando ilhotas pancreáticas com estrutura comprometida e fraca marcação para insulina (200X).

Figura 39. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon dos animais diabéticos não tratados (A e B) e tratados com inibidor de DPP-4 (C e D) incorporado à ração *ad libitum*, após 30 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 30 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais foram eutanasiados e tiveram o pâncreas coletado. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em secções de 5µm, para a realização da reação de imunohistoquímica para glucagon e visualizado em microscópio óptico. A. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4. A. Animais diabéticos não tratados com iDPP-4 após 30 dias (100X). B. Animais diabéticos não tratados com iDPP-4. Visão aproximada de uma pequena ilhota com alta marcação para glucagon (200X). C. Animais diabéticos tratados com iDPP-4 após 30 dias (100X). D. Animais diabéticos tratados com iDPP-4 após 30 dias apresentando ilhotas pancreáticas com marcação para glucagon (200X).

5.2.7.3 Análises histológicas dos animais diabéticos tratados e não tratados após 90 dias

As análises histológicas (coloração com hematoxilina e eosina) demonstraram que os animais não tratados (Figura 40 A e B) apresentam uma extensa destruição da porção exócrina formada pelos ácinos e uma perda na integridade das ilhotas pancreáticas. Já, após 90 dias de tratamento dos animais diabéticos com o iDDP-4, alguns animais diabéticos tratados apresentaram um aumento do número de pequenas ilhotas pancreáticas, geralmente encontradas nas proximidades dos vasos sanguíneos (Figura 40 C e D).

Os animais diabéticos não tratados com inibidor de DPP-4 (Figura 41 A e B) apresentaram um número escasso de ilhotas pancreáticas, enquanto que alguns animais diabéticos tratados apresentaram um aumento de pequenas ilhotas pancreáticas, embora esse aumento não tenha sido estatisticamente significativo (Figura 41 C e D, Tabela 9).

Os animais diabéticos não tratados e tratados com iDDP4 após 90 dias apresentaram intensa marcação para glucagon em suas ilhotas (Figura 42.C). As ilhotas pequenas, distribuídas ao redor dos vasos, apresentaram escassa marcação para insulina (Figura 41.C) e intensa marcação para glucagon (Figura 42.C).

Figura 40. Análise histológica do pâncreas dos animais diabéticos não tratados (A e B) e tratados com inibidor de DPP-4 (C e D) incorporado à ração *ad libitum*, após 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDPP-4, os animais foram eutanasiados e tiveram o pâncreas coletado. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em seções de 5µm, corado com hematoxilina-eosina e visualizado em microscópio óptico. A. Animais diabéticos não tratados com iDPP-4 após 90 dias. Visão geral da estrutura pancreática, área acinosa defeituosa e número de ilhotas pancreáticas diminuídas (40X). B. Animais diabéticos não tratados com iDPP-4, visão aproximada da estrutura comprometida de uma ilhota pancreática (200X). C. Animais diabéticos tratados com iDPP-4 após 90 dias apresentando ilhotas pancreáticas em tamanhos diminuídos e em número aumentado (40X). D. Animais diabéticos tratados com iDPP-4 após 90 dias, ilhotas pancreáticas apresentaram uma estrutura comprometida e tamanho diminuído (100X).

Figura 41. Análise da massa de células beta produtoras de insulina dos animais diabéticos não tratados (A e B) e tratados com inibidor de DPP-4 (C e D) incorporado à ração *ad libitum*, após 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais foram eutanasiados e tiveram o pâncreas coletado. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em seções de 5µm, para a realização da reação de imunohistoquímica para insulina e visualizado em microscópio óptico. A. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4 após 90 dias. Visão geral da estrutura pancreática com número escasso de ilhotas pancreáticas (40X). B. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4. Visão aproximada de uma pequena ilhota (200X). C. Animais diabéticos tratados com iDDP-4 após 90 dias apresentando um número aumentado de ilhotas pancreáticas pequenas (40X). D. Animais diabéticos tratados com iDDP-4 após 90 dias apresentando ilhotas pancreáticas com estrutura comprometida e fraca marcação para insulina (200X).

Figura 42. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon dos animais diabéticos não tratados (A e B) e tratados com inibidor de DPP-4 (C e D) incorporado à ração *ad libitum*, após 90 dias de tratamento. Após serem considerados diabéticos, os animais receberam dieta controle (AIN-93M Purificada) ou dieta contendo MK0431 durante 90 dias (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) *ad libitum*. Após o término do tratamento com o iDDP-4, os animais foram eutanasiados e tiveram o pâncreas coletado. O pâncreas foi incluído em parafina, cortado em seções de 5µm, para a realização da reação de imunohistoquímica para glucagon e visualizado em microscópio óptico. A. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4 após 90 dias. Visão geral da estrutura pancreática com número escasso de ilhotas pancreáticas (100X). B. Animais diabéticos não tratados com iDDP-4. Visão aproximada de uma pequena ilhota (400X). C. Animais diabéticos tratados com iDDP-4 após 90 dias apresentando um número aumentado de ilhotas pancreáticas ao redor de vasos (100X). D. Animais diabéticos tratados com iDDP-4 após 90 dias apresentando ilhotas pancreáticas com intensa marcação para glucagon (200X).

Tabela 9. Número de ilhotas pancreáticas positivas para insulina em cortes histológicos do pâncreas dos animais diabéticos tratados e não tratados com inibidor de DDP-4 incorporado à ração *ad libitum*, após 30 e 90 dias de tratamento.

Grupos Experimentais	Dias de tratamento	
	30	90
Diabéticos	2.750 ± 0.478	3.333 ± 0.881
Diabéticos+iDPP4	4.000 ± 0.912	4.750 ± 0.478
WT	16.33 ± 0.881	

Após a realização imunohistoquímica para insulina, foram escolhidos aleatoriamente 4 animais tratados e 4 animais não tratados com o iDDP-4, após 30 e 90 dias de tratamento. Para os animais controles selvagens (WT) foram utilizados dois animais. Para cada animal foram analisadas três lâminas contendo três cortes histológicos cada. Dentro da mesma lâmina, os cortes foram espaçados de 25-35 µm entre cada um deles, totalizando nove cortes diferentes para cada animal (diabético tratado, não tratado e WT). Cada corte teve sua extensão analisada por inteiro para a realização da contagem das ilhotas pancreáticas marcadas para insulina. Os valores acima representam a média do número de ilhotas pancreáticas encontradas durante a varredura dos nove cortes de cada animal, + ou – o desvio padrão.

6. Discussão

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma das doenças mais comuns dentre as doenças crônicas pediátricas (Dabelea, 2009). Aproximadamente 70 mil crianças, com idade entre 14 anos ou menos, desenvolvem DM1 no mundo anualmente (Diabetes Atlas 3ed., 2007). A primeira linha de tratamento para o DM1 ainda é a terapia de reposição de insulina, a qual melhora a qualidade e o tempo de vida do paciente. Nesse contexto, a descoberta de novos tratamentos que o diabetes tipo 1 que impeçam ou diminuam suas complicações crônicas, é de extrema importância para saúde pública.

No passado, acreditava-se que a perda de células beta pancreáticas era um processo irreversível. Contudo, estudos recentes indicam que células beta residuais e funcionais mantêm-se conservadas em pacientes DM1 muitos anos após o diagnóstico. Além disso, a massa de células beta pode se expandir em resposta a diferentes estímulos, como ao aumento metabólico, à obesidade e à gestação. Finalmente, a célula beta pode se replicar, diferenciar e transdiferenciar a partir de células endócrinas e não-endócrinas sob condições específicas (Keenan *et al.*, 2010; Perl *et al.*, 2010). Desde modo, estes dados encorajam o uso de terapias alternativas que possibilitem a manutenção ou regeneração de células beta residuais funcionais, mesmo depois de muitos anos de diagnóstico do DM1.

A terapia baseada em incretinas, além de controlar os níveis glicêmicos a partir da estimulação da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e da supressão de secreção de glucagon pelas células alfa, promove uma melhora da proliferação e atua na inibição da apoptose das células beta. Assim, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou em 2006, diferentes medicamentos para o tratamento do DM2, dos quais podemos destacar os análogos/miméticos de GLP-1 e os inibidores de DPP-4. Desde a aprovação para uso clínico, estes medicamentos têm demonstrado eficácia terapêutica no DM2, e os mesmos passaram a ser testados em modelos animais e pacientes com DM1 em virtude de suas ações antidiabéticas.

Na literatura científica existem poucos estudos analisando o uso de inibidores de DPP-4 no tratamento do DM1, em especial estudos que avaliaram as possíveis alterações na reposta imunoendocrinológica após o tratamento com o medicamento. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia terapêutica do uso de inibidor de DPP-4 em um modelo murino de DM1 quimicamente induzido por estreptozotocina e os mecanismos imunoendocrinológicos envolvidos.

Diferentes tipos de modelos animais de DM-1 são induzidos a partir de drogas diabetogênicas, especialmente a estreptozotocina e aloxana. O mecanismo de ação dessas drogas são idênticos e envolve captação da droga via transportador de glicose GLUT2 presente nas células beta e consequente dessas células por necrose. A produção de espécies reativas de oxigênio no caso da aloxana, e alquilação de DNA no caso da estreptozotocina, são responsáveis pela ação tóxica destas drogas (Gaulton *et al.*, 1985; Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008). O modelo de DM1 quimicamente induzido por múltiplas doses de estreptozotocina, além de causar um processo de insulite (inflamação nas ilhotas pancreáticas) e hiperglicemia resultante da destruição seletiva de células β produtoras de insulina, também apresenta algumas alterações imunológicas presentes no DM1 em humanos (Paik *et al.*, 1980; Leiter, 1982). Devido a várias evidências do importante papel imunológico no modelo de DM1 induzido por baixas doses estreptozotocina (Nakamura *et al.*, 1984; Klinkhammer *et al.*, 1988), o presente estudo optou por este modelo de indução do DM1.

O modelo de DM1 foi desenvolvido em camundongos C57Bl/6 machos, com 8 semanas de idade, após 12 horas de jejum, através da administração intraperitoneal de 5 doses (42 mg/kg) diárias e consecutivas de estreptozotocina. Os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glicemia apresentaram-se acima de 250 mg/dL, por mais de duas medições consecutivas pela manhã (não-jejum). Observamos que os animais tornaram-se diabéticos cerca de 5-7 dias após a última dose administrada de estreptozotocina.

O primeiro passo do presente estudo foi a padronização da melhor de administração do iDPP-4. Dentre os inibidores de DPP-4 disponíveis no mercado podemos citar a sitagliptina (MK-0431, Januvia; MerckSharp&Dhome) e a vildagliptina (LAF237, Galvus; Novartis). O inibidor escolhido neste trabalho foi a sitagliptina (MK-0431, Januvia, MerckSharp&Dhome). A sitagliptina é um medicamento de longa duração e necessita somente de uma administração ao dia em pacientes com DM2.

Tendo em vista que o medicamento composto pelo iDPP-4 deve ser administrado via oral, optamos pelo método de gavagem durante um período de 30 dias de tratamento. Os animais diabéticos foram tratados com doses de 100, 200 e 300 mg iDPP-4/Kg de animal, administradas duas vezes ao dia.

Durante os 30 dias de tratamento não foi possível observar diferenças significativas nos níveis glicêmicos dos animais tratados com iDPP-4 via gavagem em relação ao grupo diabético não tratado. Em seguida verificamos se a administração do medicamento seria capaz de diminuir os níveis glicêmicos ao longo do tempo após administração do iDPP-4. Após a dosagem da glicemia basal dos animais no tempo zero, os grupos tratados receberam a dose

diária de iDPP-4 via gavagem e então a curva glicêmica foi acompanhada por 30, 90, 150 e 270 minutos após a administração do medicamento. Foi demonstrado que o medicamento foi capaz de diminuir os níveis glicêmicos dos animais diabéticos tratados (G100, G200 e G300) minutos após receberem o tratamento com iDPP-4, porém somente 90 minutos após a gavagem esta diferença foi estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado com iDPP-4. Este mesmo efeito foi observado em um modelo de DM1 em ratos, no qual a administração de inibidor de DPP-4 mostrou-se eficiente no controle glicêmico cerca de 20-40 minutos após sua administração. Após este período de tempo, os níveis glicêmicos dos animais diabéticos tratados e não tratados apresentam-se iguais (Pospisilik *et al.*, 2003).

A inibição de DPP-4 possui como função principal o aumento dos níveis de incretinas circulantes, em especial o hormônio GLP-1. Em diferentes trabalhos utilizando o iDPP-4 para o tratamento de animais com DM2, foi possível observar uma melhora na sensibilidade à insulina e uma diminuição da glicemia em tratamentos a longo prazo (Pospisilik *et al.*, 2002a; Pospisilik *et al.*, 2002b). Tendo em vista os resultados obtidos acima descritos, verificamos neste estudo se o mesmo ocorria quando os animais tratados apresentavam um quadro de DM1 aos invés de DM2. Após 30 dias de administração do iDPP-4 via gavagem, os grupos experimentais G100, G200, G300 e o grupo diabético não tratado com iDPP-4 foram eutanasiados na ausência de jejum e tiveram amostras de sangue coletadas. O soro dos animais foi utilizado para dosagem de GLP-1, glucagon e insulina. Os níveis de GLP-1 séricos aumentaram significativamente nos animais diabéticos tratados com iDPP4, e conseqüentemente observamos uma diminuição de glucagon e um aumento de insulina sérica. No entanto, os níveis de insulina aumentaram de maneira discreta, e foi observado que nem todos os grupos experimentais tratados apresentaram um aumento significativo deste hormônio. Em um estudo utilizando modelo de DM1 induzido por estreptozotocina, os camundongos que receberam MK0431 incorporado à ração obtiveram um aumento significativo de GLP-1 sérico após 30 dias de tratamento, porém os níveis glicêmicos e a razão insulina/glucagon não foram alterados (Kim *et al.*, 2008).

Além da capacidade de promover alterações hormonais em modelos de DM1, os inibidores de DPP-4 também possuem uma capacidade imunomoduladora importante, podendo modular a função de diversas células do sistema imunológico. Já foi demonstrado em diferentes estudos utilizando iDPP-4 que o uso destes medicamentos está relacionando com a diminuição da proliferação de linfócitos T *in vitro* (Reinhold *et al.*, 1998) e a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* (Dobrian *et al.*, 2010). Além disso, o uso de análogos de GLP-1, como o exenatide, mostrou-se eficaz em aumentar

frequência de células Tregs *in vivo* em camundongos NOD tratados (Xue *et al.*, 2008). Sendo assim, o tratamento com iDPP-4 poderia modular respostas imunes e induzir a geração de células Tregs *in vivo* no modelo de DM1 quimicamente induzido por estreptozotocina. No presente estudo, os animais tratados com iDPP-4 via gavagem obtiveram uma tendência em aumentar a frequência de células Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no baço e linfonodos pancreáticos, porém este aumento não foi estatisticamente significativo. Após analisar o potencial do tratamento com iDPP-4 via gavagem em aumentar a frequência de células Tregs e modular o perfil hormonal (concentração GLP-1, insulina e glucagon) dos animais diabéticos, decidimos administrar o iDPP4 incorporado à ração, uma vez que diversos relatos na literatura evidenciaram bons efeitos terapêuticos com esta via de administração. Em trabalhos recentemente publicados por Kim e colaboradores, o inibidor de DPP-4 MK0431 foi incorporado à ração para que os animais tratados ingerissem o inibidor durante a alimentação (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). Nestes estudos, o medicamento MK0431 foi incorporado à ração e os animais diabéticos foram alimentados *ad libitum*, na proporção de 4 gramas de MK0431 para cada quilograma de ração.

Após serem considerados diabéticos, os camundongos foram divididos em dois grupos, animais submetidos a dieta controle (AIN-93M Purificada) ou animais submetidos a ração contendo iDPP-4 (4g MK0431/Kg adicionado a ração AIN-93M Purificada) durante 30 dias consecutivos. Os animais foram avaliados semanalmente quanto ao seu peso corporal e níveis de glicose sanguínea. Os animais foram avaliados sempre no mesmo horário, pela manhã e na ausência de jejum. Não houve diferenças significativas na quantidade de ração ingerida pelos diferentes grupos experimentais. O peso dos animais tratados com iDPP-4 não sofreu alteração durante os 90 dias de tratamento, ao contrário do grupo submetido a ração controle que mostrou uma queda de peso nos primeiros 40 dias de experimento. Desta forma, podemos sugerir que a administração do inibidor de DPP-4 impediu a perda de peso, decorrente da doença, em camundongos diabéticos submetidos a esta terapia. No entanto, este fenômeno ainda é controverso na literatura. Pospisilik e colaboradores (2003), utilizando um modelo de DM1 em ratos tratados com iDPP-4, observaram que os animais tratados ganharam peso durante o período experimental (50 dias) quando comparados com grupo dos animais diabéticos não tratados com iDPP-4 (Pospisilik *et al.*, 2003). Além disso, camundongos com DM2 induzido a partir de dieta hipercalórica exibiram redução significativa do ganho de peso ao longo do tratamento com inibidor (Lamont & Drucker, 2008). Por outro lado, outro estudo utilizando dieta hipercalórica e administração de estreptozotocina como modelo murino de

DM2, avaliou a administração de diferentes doses de iDPP-4 nos animais durante 12 semanas de tratamento e não observou diferenças no peso e na ingestão de ração (Mu *et al.*, 2006).

Além do peso corporal, as glicemias dos camundongos diabéticos tratados e não tratados com iDDP-4 também foram avaliadas semanalmente. No decorrer dos 30 dias de tratamento, os animais não apresentaram diferenças significativas nas médias glicêmicas (não-jejum) em relação ao grupo submetido a dieta controle. O mesmo pode ser observado no teste de tolerância oral à glicose, onde o grupo tratado com iDPP4 apresentou níveis glicêmicos semelhantes ao grupo diabético não tratado durante todo período avaliado. A ausência de resposta a estes estímulos também foi observada em um estudo pioneiro de tratamento com iDPP-4 em modelo de DM1 (Kim *et al.*, 2008), a qual pode ser justificada pela escassez de ilhotas nos pâncreas dos animais diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Os resultados dos experimentos utilizando 30 dias de tratamento não se mostraram promissores em relação ao controle glicêmico. Além disso, não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de insulina e glucagon. Por outro lado, a glicemia de jejum dos animais diabéticos tratados com iDPP-4 mostrou-se diminuída em relação aos animais diabéticos não tratados. Corroborando este achado, Matveyenko *et al.* mostraram que ratos com DM2 tratados com iDPP-4 (sitagliptina) durante 12 semanas apresentaram uma diminuição significativa da glicemia de jejum (Matveyenko *et al.*, 2009). Sendo assim, um dos pontos positivos da terapia com iDDP4 é contribuição para a melhora do controle metabólico dos animais com DM1.

Além das características endocrinológicas avaliadas durante o tratamento, foi investigado o perfil imunológico dos animais diabéticos tratados com iDPP-4 após 30 dias. Tendo em vista que diversas subpopulações celulares do sistema imunológico possuem um papel na patogênese do DM1, as células T ainda permanecem como principais responsáveis pela destruição de células beta produtoras de insulina. No DM1, fatores genéticos, fatores ambientais e falhas nos mecanismos de regulação da resposta imune resultam na perda da autotolerância e no desenvolvimento respostas autoimunes direcionadas contra as células beta pancreáticas. Os linfócitos TCD8 e TCD4 são os principais integrantes deste processo autoimune, no qual o resultado final é a perda progressiva da massa de células beta pancreáticas. Desta forma, ficou evidente ao longo dos anos, que o tipo de intervenção imunológica mais efetiva no DM1 é aquela baseada na inibição ou modulação da função dos linfócitos T (Roep & Peakman, 2011). Com isso, avaliar a frequência de subpopulações de linfócitos T antes e após o tratamento com iDPP-4 foi um dos focos do presente trabalho.

Após os 30 dias de tratamento, no baço dos animais diabéticos tratados com iDPP-4 foi observado um aumento na frequência de células T $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. Este mesmo achado também foi observado em linfonodos periféricos dos camundongos NOD tratados com análogo de GLP-1 (Hadjiyanni *et al.*, 2008).

Na década passada, diferentes pesquisas na área de genética e imunologia facilitaram o entendimento dos mecanismos de tolerância central e periférica, e também como sua “quebra” pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes. O desequilíbrio entre as células T efectoras e as células T reguladoras é um fator crítico para o desenvolvimento desta classe de doenças (Sakaguchi *et al.*, 2012). Análises genéticas e imunológicas de pacientes com doenças autoimunes têm sido importantes para decifrar os mecanismos de autotolerância. Uma desordem autoimune fatal é observada em pacientes (denominada IPEX, *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) que exibem mutações no gene FOXP3. Nesses pacientes, a geração e função das células Tregs são prejudicadas, resultando em falhas nos mecanismos de tolerância periférica, que culminam no desenvolvimento de várias desordens autoimunes (Sakaguchi, 2005).

Em modelos animais, a depleção de células $CD4^+CD25^+$ em camundongos adultos saudáveis, conduz ao desenvolvimento espontâneo de uma variedade de desordens autoimunes que são imunologicamente similares às doenças humanas, como tiroidite e DM1 (Sakaguchi *et al.*, 1995). Na tentativa de aumentar o número de células Tregs, Tang e colaboradores (2004) desenvolveram uma nova metodologia de expansão *in vitro* dessas células (anti-CD3+anti-CD28+IL-2), permitindo a manutenção de seu fenótipo e de sua capacidade supressora. Os autores demonstraram uma reversão do diabetes em camundongos NOD após transferência adotiva dessas células Tregs expandidas *in vitro* (Tang *et al.*, 2004).

No presente estudo, a frequência de linfócitos T $CD4^+$ ($CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ / $CD4^+CD25^{hi}CTLA4^+$) com perfil imunorregulador também foi avaliada. Um aumento significativo da frequência de células Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ e $CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ foi observado no baço dos animais tratados com iDPP-4 por 30 dias em comparação ao grupo não tratado. Diferentes trabalhos da literatura descreveram a importância das células Tregs na manutenção da homeostase imunológica e controle de respostas inflamatórias e autoimunes, tanto em humanos quanto em modelos animais (revisado por Josefowicz & Rudensky, 2009).

Em 2008, um grupo de pesquisa avaliou o efeito da administração de um análogo de GLP-1 em camundongos NOD (fase inicial da doença) durante 26 semanas. O estudo revelou a presença de receptores de GLP-1 nos órgãos linfóides, incluindo baço, timo e linfonodos, evidenciando uma possível ação do análogo de GLP-1 no sistema imunológico. No entanto, a

administração do medicamento foi associada com uma diminuição significativa no número de células T reguladoras $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no timo e nenhuma mudança foi observada nos outros órgãos linfóides (Hadjiyanni *et al.*, 2008). Já em outro estudo, a utilização de iDPP-4 para o tratamento de camundongos NOD, revelou que os animais tratados que apresentaram remissão da doença (glicemia menor que 200 mg/dL) possuíam um número aumentado de células Tregs no timo quando comparados com animais NOD diabéticos sem tratamento e tratados que não responderam (Tian *et al.*, 2010). Um aumento significativo destas células também foi encontrado nos linfonodos pancreáticos e no pâncreas, mas não em outros linfonodos. Estes achados sugerem que o aumento da frequência de células Tregs ocorre não somente em órgãos linfóides, mas também no pâncreas, e constitui um fator crítico para o controle da autoimunidade (Tian *et al.*, 2010). Desse modo, o aumento da frequência de células Tregs, induzida pelo tratamento com iDPP-4, pode constituir um mecanismo de proteção e preservação da massa de células beta pancreáticas.

Uma possível explicação para o aumento da frequência de células Tregs, decorrente do tratamento com inibidores de DPP-4, poderia ser o aumento da secreção de TGF- β no microambiente pancreático. Diferentes estudos *in vivo* demonstraram que o TGF- β é necessário para a manutenção da função das células Tregs e para a expressão de Foxp3 (Huber *et al.*, 2004; Schramm *et al.*, 2004). Em 1997, foi demonstrado que o uso de inibidores de DPP-4 foi capaz de induzir a secreção de TGF- β por células mononucleadas de sangue periférico e células T estimuladas *in vitro* (Reinhold *et al.*, 1997a). Num estudo com camundongos NOD foi demonstrado que pulsos de TGF- β em ilhotas pancreáticas durante a fase inicial do diabetes foi suficiente para inibir o desenvolvimento da doença através da expansão do *pool* de células T $CD4^+CD25^+$ presentes no interior das ilhotas. Isso demonstra o importante potencial do TGF- β e células Tregs em controlar, ou até mesmo inibir, uma doença autoimune (Peng *et al.*, 2004).

O CD26 é uma peptidase associada à membrana com atividade de DPP-4 no seu domínio extracelular e é uma molécula expressa na superfície de linfócitos. Esta proteína contribui para a regulação do desenvolvimento, da maturação e migração de linfócitos T, produção de citocinas e produção de anticorpos T-dependentes (Yan *et al.*, 2003). A inibição da DPP-4 suprime a proliferação de células T e a produção de citocinas Th1, bem como estimula a secreção de TGF- β (revisado por Reinhold *et al.*, 1997a). Foi demonstrado também que os inibidores de DPP-4 exibem o mesmo efeito inibitório do TGF- β sobre a inibição de síntese de DNA e produção de citocinas por linfócitos (Reinhold *et al.*, 1994).

Em estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, foi demonstrado que a atividade de DPP-4 associada com CD26 promove um importante papel na ativação de células T autorreativas. Assim, a inibição da atividade de DPP-4 *in vivo*, fornece uma nova abordagem para a supressão da autoimunidade de tecidos específicos (Reinhold et al., 2002). Deste modo, o uso de inibidores de DPP-4 poderia estar associado com aumento da secreção de TGF- β o que levaria a uma diminuição da ativação de linfócitos T e conseqüentemente contribuiria para o controle da resposta imune exacerbada existente no DM1.

Em nosso estudo, após 30 dias de tratamento com o iDDP-4, apesar de observarmos um aumento de células Tregs no baço dos animais tratados, não observamos uma melhora no padrão inflamatório do microambiente pancreático. Em geral, os níveis de citocinas inflamatórias não foram diferentes quando comparamos animais diabéticos tratados ou não com o iDDP-4 (após 30 dias de tratamento), no entanto houve uma diminuição significativa de IFN- γ nos animais tratados. Esses resultados sugerem que um tratamento de longo prazo (90 dias) possa ser mais eficiente em modular a resposta imunológica em comparação com um tratamento de curto prazo (30 dias).

Ao final dos 90 dias de tratamento com iDPP-4 foi possível verificar uma diminuição nos níveis glicêmicos dos animais tratados quando comparados com os camundongos não tratados. Em um dos primeiros estudos que relatou a utilização de GLP-1 exógeno em pacientes DM1, foi observada a capacidade desse hormônio de diminuir os níveis de glicemia de jejum via diminuição da concentração de glucagon (Creutzfeldt *et al.*, 1996).

Porém, em nosso estudo, não foi possível observar diferenças significativas nos níveis séricos de glucagon nos animais diabéticos tratados com iDPP-4. Concomitante a diminuição dos níveis de glicose sanguínea dos animais tratados com iDDP-4, observamos um aumento da concentração sérica de insulina nos camundongos tratados, após 90 dias de tratamento. A secreção de insulina é controlada por vários fatores (aminoácidos, catecolaminas, glucagon, hormônios intestinais), porém o nível de glicose sanguínea ainda é o maior estímulo para a secreção deste hormônio. Drucker *et al.*, (1987) demonstraram que o GLP-1 auxilia a formação de AMP cíclico, bem como aumenta os níveis de RNAm de insulina e sua liberação por uma linhagem de células derivadas de insulinoma de ratos. Estes resultados indicam que o GLP-1 pode ser um modulador fisiológico da expressão do gene da insulina (Drucker *et al.*, 1987), e conseqüentemente, da sua síntese. Em outro trabalho, o comportamento de ilhotas humanas em cultura foi analisado quanto à secreção de insulina frente ao estímulo de GLP-1. Como esperado, ocorreu um aumento da secreção de insulina quando estimulada por glicose na presença de GLP-1, quando comparada somente ao estímulo da glicose (Fehmann *et al.*,

1995). Desta forma, podemos concluir que o GLP-1 está intimamente relacionado com a produção/secreção de insulina.

Em nosso trabalho, tendo em vista os níveis elevados de insulina circulante nos animais tratados com iDDP-4 quando comparados aos animais diabéticos não tratados, avaliamos também nesses animais o nível de preservação das ilhotas pancreáticas e a massa de células pancreáticas. Foi possível observar uma intensa destruição da massa de células beta nos animais diabéticos não tratados após 30 e 90 dias de doença em comparação com o grupo tratado com o iDDP-4. No entanto, ambos grupos experimentais apresentaram uma menor marcação para insulina quando comparados com os animais selvagens (WT).

Uma característica comum do DM1 é a expansão de células alfa produtoras de glucagon para compensar a destruição da massa de células beta pancreáticas. Após 90 dias, alguns dos animais diabéticos tratados com iDPP-4, apresentaram um aumento de pequenas ilhotas ao redor de vasos, dado não observado após 30 dias de tratamento. Estas pequenas ilhotas apresentaram fraca marcação para insulina e intensa marcação para glucagon. Em um trabalho utilizando estreptozotocina para indução de DM1 em camundongos, foi descrito alguns dos fatores que poderiam explicar a expansão das células alfa durante o DM1 experimental (Li *et al.*, 2000). Primeiramente, devido à perda preferencial de células beta neste modelo, a proliferação de células alfa seria aumentada nas ilhotas como um mecanismo compensatório. Isto pode também, conduzir a uma localização mais central das células alfa dentro das ilhotas, já que as células beta localizadas centralmente estão morrendo e desaparecendo. Em segundo lugar, após a administração de estreptozotocina foi observado uma aumento de células alfa no ducto pancreático, que podem representar células novas ou células que migraram de ilhotas já existentes (Li *et al.*, 2000).

Em camundongos NOD, em virtude da perda de massa de células beta, nota-se a formação de novas células alfa no ducto pancreático a partir de progenitores localizados neste local. Acredita-se ainda, que a neogênese das células beta das ilhotas ocorre de maneira especial, pois foi sugerido que as células-tronco das ilhotas expressam múltiplos hormônios e que a existência de células-tronco embrionárias positivas para PDX-1 e glucagon seriam capazes de originar células produtoras de insulina (O'reilly *et al.*, 1997).

No primeiro estudo que utilizou tratamento com iDPP-4 em longo prazo em modelo de DM1 induzido por dose única de estreptozotocina, os autores observaram uma preservação das ilhotas e um aumento de células beta decorrentes de uma aparente neogênese. A neogênese foi caracterizada pelo aumento (35%) do número de pequenas ilhotas e número

total de células beta (120%) fortemente marcadas para insulina observadas nos animais tratados com iDPP-4 em relação ao grupo não tratado (Pospisilik *et al.*, 2003).

O aumento do número de ilhotas muito pequenas e intensivamente marcadas para insulina é um fato consistente observado em estudos anteriores, que relacionam aumento de GLP-1 com neogênese de ilhotas. A utilização de análogo de GLP-1 em animais com DM2 estimulou o aumento da expressão de PDX-1 (*Pancreatic duodenal homeobox-1*, fator de transcrição com funções essenciais para o desenvolvimento do pâncreas, formação de ilhotas e manutenção do fenótipo de célula beta) nos ductos pancreáticos e no pâncreas exócrino. Esta observação é de extrema relevância, já que o epitélio dos ductos pancreáticos e os ductos terminais centrolobulares no tecido acinar são as fontes para a diferenciação de novas células beta (neogênese) (Stoffers *et al.*, 2000).

Perfetti *et al.* (2000) utilizaram um análogo de GLP-1 para tratamento de animais com DM2, e observaram um aumento dos níveis de expressão de PDX-1 nas ilhotas e marcação positiva para PCNA (antígeno nuclear de célula em proliferação) no epitélio dos ductos pancreáticos. Estas observações sugerem uma participação importante das incretinas no aumento da proliferação das células beta em animais diabéticos (Perfetti *et al.*, 2000). Sendo assim, o GLP-1 seria um dos responsáveis por aumentar a capacidade proliferativa das células dos ductos pancreáticos, e o aumento da expressão de PDX-1 induziria a diferenciação destas células em proliferação em células produtoras de insulina (Stoffers *et al.*, 2000).

Desta forma, os inibidores de DPP-4 podem agir aumentando os níveis de GLP-1, o qual seria um dos responsáveis pela possível neogênese de ilhotas nos animais diabéticos tratados com iDPP-4. Os resultados obtidos em nosso estudo (redução glicemia, aumento de insulina no soro, aumento no número de pequenas ilhotas) estão de acordo com os dados da literatura acima apresentados, evidenciando um efeito positivo do tratamento com iDPP-4 no controle metabólico dos animais diabéticos, bem como na expansão de células produtoras de insulina.

Tendo em vista que o tratamento dos animais com DM1 a longo prazo (90 dias) com iDPP-4 foi muito eficiente em reduzir os níveis de glicemia e aumentar os níveis séricos de insulina, avaliamos também as possíveis alterações imunológicas que essa terapia poderia induzir nos camundongos diabéticos. Diversas citocinas são encontradas nas ilhotas inflamadas (insulite) em humanos e animais com DM1. As citocinas do padrão Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e outras) ativam a imunidade mediada por células (linfócitos T, células *natural killers* e macrófagos), enquanto as citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-10 e outras) ativam imunidade humoral (produção de anticorpos por células B) (revisado por Rabinovitch, 1998).

O balanço na produção destas citocinas (Th1 x Th2) está diretamente relacionado a patogênese do DM1, ou seja, na indução da destruição das células beta (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17 e IL-21) ou na contenção da autoimunidade através da supressão da resposta imunológica (IL-4, IL-10 e TGF- β) (Van Belle *et al.*, 2011). Além dos subtipos de linfócitos Th1, Th2 e T reguladores, as células Th17 abrangem um subtipo específico de células TCD4⁺ que estão associadas a um papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas e na patogênese de diferentes doenças autoimunes como artrite reumatóide, asma, dermatite, encefalomielite autoimune e outras (Costa *et al.*, 2010). As células Th17 secretam citocinas da família IL-17 (IL-17 A-F), sendo que as IL-17A e IL-17F possuem propriedades pró-inflamatórias e também são importantes para o recrutamento, ativação e migração dos neutrófilos (revisado por Moseley *et al.*, 2003; Kolls & Linden, 2004).

No presente estudo, foi realizada a dosagem de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10) presentes no homogenato pancreático de animais tratados ou não com iDPP-4. Após 90 dias de tratamento, foi observado uma diminuição dos níveis de IFN- γ e TNF- α (padrão Th1) no homogenato pancreático dos animais diabéticos tratados com iDPP-4, quando comparados com os camundongos não tratados. A presença das citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e IFN- γ produzidas por leucócitos resulta em um mecanismo de injúria e apoptose das células beta pancreáticas no modelo de diabetes induzido por múltiplas doses de STZ (Fukuda *et al.*, 2008). O papel desses mediadores solúveis no desenvolvimento do diabetes é desencadeado pelo seu efeito tóxico direto na destruição das células beta e/ou na regulação da diferenciação e função das células Th1 (Herold *et al.*, 1996). Desta forma, a diminuição destas citocinas inflamatórias pelo tratamento com iDPP-4 representa um aspecto positivo e promissor na contenção do processo autoimune do DM1.

Há diversos trabalhos na literatura que mostram a participação das células Th17 na patogênese de diversas doenças autoimunes, no entanto pouco se sabe sobre a participação dessas células Th17 no desenvolvimento do DM1. Emamaullee e colaboradores, em 2009, observaram que a inibição das células Th17, seja pela neutralização da IL-17 (anticorpo anti-IL-17) ou pela utilização da IL-25 recombinante, impediu o desenvolvimento da doença, sugerindo dessa forma um papel importante das células Th17 na patogênese do diabetes autoimune em camundongos NOD (Emamaullee *et al.*, 2009). Por outro lado, Bending e colaboradores mostraram que células Th17 altamente purificadas e isoladas de camundongos BDC2.5 promoveram a indução e o desenvolvimento do diabetes quando transplantadas em camundongos NOD.scid após se converterem em células produtoras de IFN- γ . O tratamento

desses animais com anticorpo que bloqueia a IL-17 não surtiu nenhum efeito, enfatizando o papel do IFN- γ e das células Th1 na patogenicidade da doença (Bending *et al.*, 2009). Desta forma, o papel da citocina IL-17 na indução do diabetes autoimune ainda é bastante controverso e precisa ser melhor investigado. Em nosso estudo, observamos que os animais diabéticos tratados com iDPP-4 apresentaram uma tendência em diminuir os níveis de IL-17 no pâncreas, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Por outro lado, observamos uma redução significativa dos níveis de IL-10 no tecido pancreático dos animais submetidos à terapia com iDPP-4. Atualmente existem resultados discrepantes quanto ao papel da IL-10 no diabetes autoimune. Muitos estudos têm mostrado a associação entre o aumento da produção de IL-10 e a atenuação do diabetes, sugerindo que a IL-10 possui um efeito protetor (Goudy *et al.*, 2001; Goudy *et al.*, 2003). Em contrapartida, um estudo mostrou que camundongos NOD deficientes de IL-10 apresentam uma redução no desenvolvimento espontâneo do diabetes, sugerindo um possível papel pró-inflamatório desta citocina no DM1 (Wogensen *et al.*, 1994; Rajagopalan *et al.*, 2006).

Existem relatos na literatura evidenciando a modulação da produção de citocinas e da resposta inflamatória via inibidores de DPP-4. Dobrian *et al.* (2010) trataram camundongos obesos (modelo de DM2) com sitagliptina por 12 semanas. Após tratamento, os autores observaram uma redução da expressão de RNAm de genes “inflamatórios”, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-12 nos tecidos adiposo e pancreático, além da diminuição do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo (Dobrian *et al.*, 2010). Um estudo utilizando animais NOD tratados com sitagliptina revelou a diminuição da migração de linfócitos T CD4⁺ no baço e linfonodos, além da correlação existente entre o aumento da migração de linfócitos T CD4⁺ com o aumento da atividade de DPP-4 e dos níveis de glicose (Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

Além da diminuição das citocinas observadas no ambiente pancreático dos animais diabéticos tratados com iDPP-4, nosso estudo revelou uma diminuição da porcentagem de células CD11b⁺ (macrófagos) nos linfonodos pancreáticos. A MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1/CCL2) é um potente quimioatraente de macrófagos, e pode ser produzida tanto pelas células beta, como pelas células que compõem o infiltrado inflamatório nas ilhotas, contribuindo para a exacerbação da inflamação. A administração de sitagliptina em animais com DM2, além de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias, causou uma diminuição da expressão da quimiocina MCP-1 no tecido pancreático (Dobrian *et al.*, 2010). Desta forma, o mesmo mecanismo descrito acima pode ter sido responsável (apesar

de não ter sido investigado no presente estudo) pela diminuição dos macrófagos nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos tratados por 90 dias com o iDPP-4.

Tendo em vista que a utilização de inibidores de DPP-4 resulta em um controle da inflamação, pode-se pensar que a enzima DPP-4 exerce atividade pró-inflamatória e pacientes com doenças inflamatórias/autoimunes podem apresentar alterações na atividade desta enzima. A alteração da atividade da enzima DPP-4 foi primeiramente observada no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Gotoh *et al.*, 1989). Posteriormente, foi observado que clones de células T provenientes de pacientes com esclerose múltipla expressam altos níveis de DPP-4, quando comparados com células T em repouso. A adição de inibidores de DPP-4 aos clones de células T estimulados com a proteína básica de mielina inibiu a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-4, sugerindo que a inibição da atividade de DPP-4 *in vivo* poderia suprimir a resposta inflamatória associada à EM (Reinhold *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, o tratamento dos animais diabéticos com iDDP-4 levou a um aumento dos níveis de insulina, uma diminuição da glicemia e do padrão inflamatório no microambiente pancreático. Desse modo, sugerimos o uso de inibidores de DPP-4 em longo prazo como uma nova estratégia terapêutica para o DM1 experimental e futuramente em humanos.

7. Conclusões

I - Quanto a resposta clínica e endocrinológica à administração de inibidor de DPP-4 no modelo de diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina:

- Após 30 dias de tratamento foi observado um aumento dos níveis de GLP-1, enquanto os níveis de glucagon, insulina e glicose não sofreram alterações. Isso sugere que um período de 30 dias de tratamento seja insuficiente para que o controle glicêmico seja atingido nos animais diabéticos tratados;

- Após 90 dias de tratamento, além do aumento significativo dos níveis de GLP-1, os animais diabéticos tratados apresentaram aumento de insulina sérica e diminuição da glicemia. Além disso, os animais tratados por 90 dias com inibidor de DPP-4 apresentaram um padrão histológico de ilhotas pequenas localizadas ao redor de vasos, sugerindo um possível mecanismo de neogênese de ilhotas influenciado pelo aumento dos níveis de GLP-1 no microambiente pancreático.

II - Quanto aos mecanismos imunológicos envolvidos na administração de inibidor de DPP-4 no modelo de diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina:

- Após 30 dias de tratamento foram observados um aumento da frequência das células T reguladoras no baço, uma diminuição na razão de células $TCD4^+/TCD8^+$ nos linfonodos pancreáticos e uma redução da concentração de $IFN-\gamma$ no microambiente pancreático dos animais diabéticos tratados, sugerindo um possível papel imunossupressor do inibidor de DPP-4;

- Após 90 dias de tratamento foi observado uma diminuição da razão de células $TCD4^+/TCD8^+$ e do número de macrófagos nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos tratados. Houve uma diminuição dos níveis pancreáticos de $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e IL-10 dos animais diabéticos tratados, ressaltando o papel anti-inflamatório do inibidor de DPP-4.

Concluindo, o tratamento do DM1 experimental com inibidor de DPP-4 foi associado com uma melhora no controle metabólico e concomitante redução do padrão inflamatório no microambiente pancreático. Portanto, o inibidor de DPP-4 apresentou um bom potencial terapêutico e imunomodulador no modelo de DM1 induzido por estreptozotocina.

8. Referências

- Ahren, B. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: clinical data and clinical implications. **Diabetes Care**, v.30, n.6, Jun, p.1344-50. 2007.
- Anderson, M S e J a Bluestone. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. **Annu Rev Immunol**, v.23, p.447-85. 2005.
- Apostolou, I e H Von Boehmer. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. **J Exp Med**, v.199, n.10, May 17, p.1401-8. 2004.
- Arechavaleta, R, *et al.* Efficacy and safety of treatment with sitagliptin or glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin monotherapy: a randomized, double-blind, non-inferiority trial. **Diabetes Obes Metab**, v.13, n.2, Feb, p.160-8. 2011.
- Atkinson, M A e G S Eisenbarth. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v.358, n.9277, Jul 21, p.221-9. 2001.
- Baecher-Allan, C e D a Hafler. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. **Immunol Rev**, v.212, Aug, p.203-16. 2006.
- Baggio, L L e D J Drucker. Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. **Annu Rev Med**, v.57, p.265-81. 2006.
- Behme, M T, *et al.* Glucagon-like peptide 1 improved glycemic control in type 1 diabetes. **BMC Endocr Disord**, v.3, n.1, Apr 10, p.3. 2003.
- Bending, D, *et al.* Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. **J Clin Invest**, v.119, n.3, Mar, p.565-72. 2009.
- Bluestone, J A, *et al.* Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, v.464, n.7293, Apr 29, p.1293-300. 2010.
- Buteau, J, *et al.* Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. **Diabetologia**, v.47, n.5, May, p.806-15. 2004.
- Cho, J H e P K Gregersen. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. **N Engl J Med**, v.365, n.17, Oct 27, p.1612-23. 2011.
- Coppieters, K T, *et al.* Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. **J Exp Med**, v.209, n.1, Jan 16, p.51-60. 2012.
- Cordero, O J, *et al.* Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. **Immunobiology**, v.197, n.5, Nov, p.522-33. 1997.
- Costa, V S, *et al.* Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. **Diabetes Res Clin Pract**, v.88, n.3, Jun, p.222-6. 2010.

Couri, C E, *et al.* C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v.301, n.15, Apr 15, p.1573-9. 2009.

Creutzfeldt, W. The incretin concept today. **Diabetologia**, v.16, n.2, Feb, p.75-85. 1979.

Creutzfeldt, W. The [pre-] history of the incretin concept. **Regul Pept**, v.128, n.2, Jun 15, p.87-91. 2005.

Creutzfeldt, W O, *et al.* Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. **Diabetes Care**, v.19, n.6, Jun, p.580-6. 1996.

Curotto De Lafaille, M A, *et al.* CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. **J Immunol**, v.173, n.12, Dec 15, p.7259-68. 2004.

Dabelea, D. The accelerating epidemic of childhood diabetes. **Lancet**, v.373, n.9680, Jun 13, p.1999-2000. 2009.

Danke, N A, *et al.* Autoreactive T cells in healthy individuals. **J Immunol**, v.172, n.10, May 15, p.5967-72. 2004.

De Meester, I, *et al.* CD26, let it cut or cut it down. **Immunol Today**, v.20, n.8, Aug, p.367-75. 1999.

Dilorenzo, T P e D V Serreze. The good turned ugly: immunopathogenic basis for diabetogenic CD8+ T cells in NOD mice. **Immunol Rev**, v.204, Apr, p.250-63. 2005.

Dobrian, a D, *et al.* Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.300, n.2, Feb, p.E410-21. 2010.

Drucker, D J e M a Nauck. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v.368, n.9548, Nov 11, p.1696-705. 2006.

Drucker, D J, *et al.* Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.10, May, p.3434-8. 1987.

Dupre, J, *et al.* Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. **J Clin Endocrinol Metab**, v.37, n.5, Nov, p.826-8. 1973.

Ellis, S L, *et al.* Effect of sitagliptin on glucose control in adult patients with Type 1 diabetes: a pilot, double-blind, randomized, crossover trial. **Diabet Med**, v.28, n.10, Oct, p.1176-81. 2011.

Elrick, H, *et al.* Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. **J Clin Endocrinol Metab**, v.24, Oct, p.1076-82. 1964.

Emamaullee, J A, *et al.* Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v.58, n.6, Jun, p.1302-11. 2009.

Eng, J, *et al.* Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. **J Biol Chem**, v.267, n.11, Apr 15, p.7402-5. 1992.

Farilla, L, *et al.* Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. **Endocrinology**, v.144, n.12, Dec, p.5149-58. 2003.

Fehmann, H C, *et al.* The effects of glucagon-like peptide-I (GLP-I) on hormone secretion from isolated human pancreatic islets. **Pancreas**, v.11, n.2, Aug, p.196-200. 1995.

Fleischer, B. A novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen. **J Immunol**, v.138, n.5, Mar 1, p.1346-50. 1987.

Fleischer, B. CD26: a surface protease involved in T-cell activation. **Immunol Today**, v.15, n.4, Apr, p.180-4. 1994.

Fontenot, J D e A Y Rudensky. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat Immunol**, v.6, n.4, Apr, p.331-7. 2005.

Fukuda, K, *et al.* c-Jun amino terminal kinase 1 deficient mice are protected from streptozotocin-induced islet injury. **Biochem Biophys Res Commun**, v.366, n.3, Feb 15, p.710-6. 2008.

Gaulton, G N, *et al.* Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. **Diabetologia**, v.28, n.10, Oct, p.769-75. 1985.

Gerli, R, *et al.* CD26 surface molecule involvement in T cell activation and lymphokine synthesis in rheumatoid and other inflammatory synovitis. **Clin Immunol Immunopathol**, v.80, n.1, Jul, p.31-7. 1996.

Ghofaili, K A, *et al.* Effect of exenatide on beta cell function after islet transplantation in type 1 diabetes. **Transplantation**, v.83, n.1, Jan 15, p.24-8. 2007.

Gorrell, M D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. **Clin Sci (Lond)**, v.108, n.4, Apr, p.277-92. 2005.

Gotoh, H, *et al.* Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clin Chem**, v.35, n.6, Jun, p.1016-8. 1989.

Goudy, K, *et al.* Adeno-associated virus vector-mediated IL-10 gene delivery prevents type 1 diabetes in NOD mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.24, Nov 20, p.13913-8. 2001.

Goudy, K S, *et al.* Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. **J Immunol**, v.171, n.5, Sep 1, p.2270-8. 2003.

Gregori, S, *et al.* Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. **J Immunol**, v.171, n.8, Oct 15, p.4040-7. 2003.

Hadjiyanni, I, *et al.* Exendin-4 modulates diabetes onset in nonobese diabetic mice. **Endocrinology**, v.149, n.3, Mar, p.1338-49. 2008.

Hafler, D A, *et al.* In vivo activated T lymphocytes in the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v.312, n.22, May 30, p.1405-11. 1985.

Herold, K C, *et al.* Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. **J Immunol**, v.156, n.9, May 1, p.3521-7. 1996.

Hopsu-Havu, V K e G G Glenner. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. **Histochemie**, v.7, n.3, p.197-201. 1966.

Hori, S e S Sakaguchi. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. **Microbes Infect**, v.6, n.8, Jul, p.745-51. 2004.

Huber, S, *et al.* Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. **J Immunol**, v.173, n.11, Dec 1, p.6526-31. 2004.

Hussain, M A e N D Theise. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. **Lancet**, v.364, n.9429, Jul 10-16, p.203-5. 2004.

Itoh, N, *et al.* Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. **J Clin Invest**, v.92, n.5, Nov, p.2313-22. 1993.

Iwamoto, Y, *et al.* Efficacy and safety of sitagliptin monotherapy compared with voglibose in Japanese patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind trial. **Diabetes Obes Metab**, v.12, n.7, Jul, p.613-22. 2010.

Josefowicz, S Z e A Rudensky. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. **Immunity**, v.30, n.5, May, p.616-25. 2009.

Keenan, H A, *et al.* Residual insulin production and pancreatic ss-cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. **Diabetes**, v.59, n.11, Nov, p.2846-53. 2010.

Kim, S J, *et al.* Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with sitagliptin (MK0431) prolongs islet graft survival in streptozotocin-induced diabetic mice. **Diabetes**, v.57, n.5, May, p.1331-9. 2008.

- Kim, S J, *et al.* Dipeptidyl peptidase IV inhibition with MK0431 improves islet graft survival in diabetic NOD mice partially via T-cell modulation. **Diabetes**, v.58, n.3, Mar, p.641-51. 2009.
- Kim, S J, *et al.* Sitagliptin (MK0431) inhibition of dipeptidyl peptidase IV decreases nonobese diabetic mouse CD4⁺ T-cell migration through incretin-dependent and -independent pathways. **Diabetes**, v.59, n.7, Jul, p.1739-50. 2010.
- Klinkhamer, C, *et al.* Specific immunity to streptozocin. Cellular requirements for induction of lymphoproliferation. **Diabetes**, v.37, n.1, Jan, p.74-80. 1988.
- Kolls, J K e A Linden. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, n.4, Oct, p.467-76. 2004.
- Kukreja, A, *et al.* Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. **J Clin Invest**, v.109, n.1, Jan, p.131-40. 2002.
- Lamont, B J e D J Drucker. Differential antidiabetic efficacy of incretin agonists versus DPP-4 inhibition in high fat fed mice. **Diabetes**, v.57, n.1, Jan, p.190-8. 2008.
- Lehuen, A, *et al.* Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. **Nat Rev Immunol**, v.10, n.7, Jul, p.501-13. 2010.
- Leiter, E H. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.79, n.2, Jan, p.630-4. 1982.
- Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v.51, n.2, Feb, p.216-26. 2008.
- Li, Z, *et al.* Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. **J Endocrinol**, v.165, n.1, Apr, p.93-9. 2000.
- Lindley, S, *et al.* Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v.54, n.1, Jan, p.92-9. 2005.
- Marguet, D, *et al.* Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.12, Jun 6, p.6874-9. 2000.
- Mathis, D, *et al.* beta-Cell death during progression to diabetes. **Nature**, v.414, n.6865, Dec 13, p.792-8. 2001.
- Matveyenko, a V, *et al.* Beneficial endocrine but adverse exocrine effects of sitagliptin in the human islet amyloid polypeptide transgenic rat model of type 2 diabetes: interactions with metformin. **Diabetes**, v.58, n.7, Jul, p.1604-15. 2009.
- Mensah-Brown, E, *et al.* Functional capacity of macrophages determines the induction of type 1 diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, v.1084, Nov, p.49-57. 2006.

Mizokami, A, *et al.* Increased population of high fluorescence 1F7 (CD26) antigen on T cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v.23, n.12, Dec, p.2022-6. 1996.

Morimoto, C e S F Schlossman. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. **Immunol Rev**, v.161, Feb, p.55-70. 1998.

Moseley, T A, *et al.* Interleukin-17 family and IL-17 receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.14, n.2, Apr, p.155-74. 2003.

Mu, J, *et al.* Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. **Diabetes**, v.55, n.6, Jun, p.1695-704. 2006.

Nakamura, M, *et al.* The role of thymic immunity and insulinitis in the development of streptozocin-induced diabetes in mice. **Diabetes**, v.33, n.9, Sep, p.894-900. 1984.

Notkins, a L. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. **J Biol Chem**, v.277, n.46, Nov 15, p.43545-8. 2002.

O'reilly, L A, *et al.* alpha-Cell neogenesis in an animal model of IDDM. **Diabetes**, v.46, n.4, Apr, p.599-606. 1997.

Orskov, C, *et al.* Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. **Diabetes**, v.42, n.5, May, p.658-61. 1993.

Ozyazgan, S, *et al.* Effect of glucagon-like peptide-1(7-36) and exendin-4 on the vascular reactivity in streptozotocin/nicotinamide-induced diabetic rats. **Pharmacology**, v.74, n.3, Jun, p.119-26. 2005.

Paik, S G, *et al.* Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.77, n.10, Oct, p.6129-33. 1980.

Palmer, J P, *et al.* C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. **Diabetes**, v.53, n.1, Jan, p.250-64. 2004.

Patterson, C C, *et al.* Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet**, v.373, n.9680, Jun 13, p.2027-33. 2009.

Peng, Y, *et al.* TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.13, Mar 30, p.4572-7. 2004.

Perfetti, R, *et al.* Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. **Endocrinology**, v.141, n.12, Dec, p.4600-5. 2000.

Perl, S, *et al.* Significant human beta-cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. **J Clin Endocrinol Metab**, v.95, n.10, Oct, p.E234-9. 2010.

Pospisilik, J A, *et al.* Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v.52, n.3, Mar, p.741-50. 2003.

Pospisilik, J A, *et al.* Long-term treatment with the dipeptidyl peptidase IV inhibitor P32/98 causes sustained improvements in glucose tolerance, insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and beta-cell glucose responsiveness in VDF (fa/fa) Zucker rats. **Diabetes**, v.51, n.4, Apr, p.943-50. 2002a.

Pospisilik, J A, *et al.* Long-term treatment with dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in the VDF Zucker rat: a euglycemic-hyperinsulinemic clamp study. **Diabetes**, v.51, n.9, Sep, p.2677-83. 2002b.

Prevot, N, *et al.* Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. **Eur J Immunol**, v.40, n.8, Aug, p.2267-76. 2010.

Rabinovitch, A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev**, v.14, n.2, Jun, p.129-51. 1998.

Rajagopalan, G, *et al.* IL-10-deficiency unmasks unique immune system defects and reveals differential regulation of organ-specific autoimmunity in non-obese diabetic mice. **Cytokine**, v.34, n.1-2, Apr, p.85-95. 2006.

Randolph, D A e C G Fathman. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. **Annu Rev Med**, v.57, p.381-402. 2006.

Rawlings, N D e A J Barrett. Families of serine peptidases. **Methods Enzymol**, v.244, p.19-61. 1994.

Reeves, P G, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Reinhold, D, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibits DNA synthesis of PWM-stimulated PBMC via suppression of IL-2 and IL-6 production. **Cytokine**, v.6, n.4, Jul, p.382-8. 1994.

Reinhold, D, *et al.* Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) induces secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes. **Immunol Lett**, v.58, n.1, Jun, p.29-35. 1997a.

Reinhold, D, *et al.* Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) and aminopeptidase N (APN, CD13) as regulators of T cell function and targets of immunotherapy in CNS inflammation. **Int Immunopharmacol**, v.6, n.13-14, Dec 20, p.1935-42. 2006.

Reinhold, D, *et al.* Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4⁺ T cell clones. **J Neuroimmunol**, v.87, n.1-2, Jul 1, p.203-9. 1998.

Reinhold, D, *et al.* The effect of anti-CD26 antibodies on DNA synthesis and cytokine production (IL-2, IL-10 and IFN-gamma) depends on enzymatic activity of DP IV/CD26. **Adv Exp Med Biol**, v.421, p.149-55. 1997b.

Rioux, J D e A K Abbas. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. **Nature**, v.435, n.7042, Jun 2, p.584-9. 2005.

Roep, B O. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**, v.46, n.3, Mar, p.305-21. 2003.

Roep, B O e M Peakman. Diabetogenic T lymphocytes in human Type 1 diabetes. **Curr Opin Immunol**, v.23, n.6, Dec, p.746-53. 2011.

Sakaguchi, S. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. **Curr Opin Immunol**, v.12, n.6, Dec, p.684-90. 2000.

Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v.22, p.531-62. 2004.

Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol**, v.6, n.4, Apr, p.345-52. 2005.

Sakaguchi, S, *et al.* Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol Rev**, v.212, Aug, p.8-27. 2006a.

Sakaguchi, S, *et al.* Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. **Nat Med**, v.18, n.1, Jan, p.54-8. 2012.

Sakaguchi, S, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**, v.155, n.3, Aug 1, p.1151-64. 1995.

Sakaguchi, S, *et al.* Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.305, p.51-66. 2006b.

Salomon, B, *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. **Immunity**, v.12, n.4, Apr, p.431-40. 2000.

Schnabel, C A, *et al.* Metabolic effects of the incretin mimetic exenatide in the treatment of type 2 diabetes. **Vasc Health Risk Manag**, v.2, n.1, p.69-77. 2006.

Schramm, C, *et al.* TGFbeta regulates the CD4⁺CD25⁺ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. **Int Immunol**, v.16, n.9, Sep, p.1241-9. 2004.

- Shevach, E M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v.30, n.5, May, p.636-45. 2009.
- Stoffers, D A. The development of beta-cell mass: recent progress and potential role of GLP-1. **Horm Metab Res**, v.36, n.11-12, Nov-Dec, p.811-21. 2004.
- Stoffers, D A, *et al.* Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. **Diabetes**, v.49, n.5, May, p.741-8. 2000.
- Suri-Payer, E e B Fritzsching. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. **Springer Semin Immunopathol**, v.28, n.1, Aug, p.3-16. 2006.
- Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v.50, n.6, p.537-46. 2001.
- Tang, Q, *et al.* In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. **J Exp Med**, v.199, n.11, Jun 7, p.1455-65. 2004.
- Tesch, G H e D J Nikolic-Paterson. Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy. **Nephron Exp Nephrol**, v.104, n.2, p.e57-62. 2006.
- Thornton, a M, *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. **J Immunol**, v.184, n.7, Apr 1, p.3433-41. 2010.
- Tian, L, *et al.* Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating beta-cell replication in nonobese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. **Endocrinology**, v.151, n.7, Jul, p.3049-60. 2010.
- Tourrel, C, *et al.* Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. **Diabetes**, v.50, n.7, Jul, p.1562-70. 2001.
- Van Belle, T L, *et al.* Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev**, v.91, n.1, Jan, p.79-118. 2011.
- Vehik, K e D Dabelea. The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof? **Diabetes Metab Res Rev**, v.27, n.1, Jan, p.3-13. 2011.
- Verspohl, E J. Novel therapeutics for type 2 diabetes: incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Pharmacol Ther**, v.124, n.1, Oct, p.113-38. 2009.
- Voltarelli, J C, *et al.* Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v.297, n.14, Apr 11, p.1568-76. 2007.
- Willheim, M, *et al.* Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. **J Allergy Clin Immunol**, v.100, n.3, Sep, p.348-55. 1997.

Wing, K e S Sakaguchi. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nat Immunol**, v.11, n.1, Jan, p.7-13. 2010.

Wogensen, L, *et al.* Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice. **J Exp Med**, v.179, n.4, Apr 1, p.1379-84. 1994.

Wu, a J, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.19, Sep 17, p.12287-92. 2002.

Xu, G, *et al.* Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. **Diabetes**, v.48, n.12, Dec, p.2270-6. 1999.

Xue, S, *et al.* Exendin-4 therapy in NOD mice with new-onset diabetes increases regulatory T cell frequency. **Ann N Y Acad Sci**, v.1150, Dec, p.152-6. 2008.

Yan, S, *et al.* Deficiency of CD26 results in a change of cytokine and immunoglobulin secretion after stimulation by pokeweed mitogen. **Eur J Immunol**, v.33, n.6, Jun, p.1519-27. 2003.

Yaron, A e F Naider. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v.28, n.1, p.31-81. 1993.

Ziegler, a G, *et al.* Accelerated progression from islet autoimmunity to diabetes is causing the escalating incidence of type 1 diabetes in young children. **J Autoimmun**, v.37, n.1, Aug, p.3-7. 2011.

9. Anexo

Figura I. Análise representativa das subpopulações de células T $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{hi}$ positivas para CTLA-4 e Foxp3 por citometria de fluxo. **A.** Controle da marcação, células na ausência de anticorpo. **B.** Análise da subpopulação de células positivas para CTLA-4 e Foxp3 dentro das células T $CD4^+CD25^+$. **C.** Análise da subpopulação de células positivas para CTLA-4 e Foxp3 dentro das células T $CD4^+CD25^{hi}$. Foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). Em seguida, os eventos da *gate* de linfócitos foram analisados por *dot plots* pela marcação com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25. Em seguida foi desenhada uma terceira *gate* na população duplo-positiva normal (A; $CD4^+CD25^+$) ou *high* (B; $CD4^+CD25^{hi}$). As porcentagens de células positivas para CTLA-4 ou Foxp3 dentro das subpopulações duplo-positiva normal (A; $CD4^+CD25^+$) ou *high* (B; $CD4^+CD25^{hi}$) estão mostradas nos histogramas. O cálculo da porcentagem de células triplo-positivas é feita multiplicando-se as porcentagens e dividindo por 100.