CARLA SADRINA RENDALL MOREIRA SÁ

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DO TIPO *TOLL -2* E *TOLL-4* E DA MOLÉCULA ADAPTADORA MyD88 NO DESENVOLVIMENTO DO DIABETES AUTO-IMUNE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

CARLA SADRINA RENDALL MOREIRA SÁ

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL -2 E TOLL-4 E DA MOLÉCULA ADAPTADORA MyD88 NO DESENVOLVIMENTO DO DIABETES AUTO-IMUNE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sá, Carla Sandrina Rendall Moreira.
Estudo da participação dos receptores do tipo *Toll-2* e *Toll-4* e da molécula adaptadora MyD88 no desenvolvimento do diabetes autoimune experimental / Carla Sandrina Rendall Moreira Sá. – São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Inflamação, diabetes mellitus autoimune, TLRs.

Versão do título para o inglês: The role of TLR-2, TLR-4 and MyD88 in the development of experimental autoimmune diabetes.

1. Inflamação 2. Diabetes autoimune experimental 3. TLRs I. Câmara, Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB095/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carla Sandrina Rendall Moreira Sá.

Título da Dissertação: Estudo da participação dos receptores do tipo *Toll-2* e *Toll-4* e da molécula adaptadora MyD88 no desenvolvimento do diabetes autoimune experimental.

Orientador(a): Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **110** nas fls. **108** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Niels Olsen Saraiva Câmara**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Estudo da participação dos receptores TLR-2, TLR-4 da molécula adaptadora MyD88 no desenvolvimento do diabetes auto-imune experimental"* do qual participam o(s) aluno(s) **Carla Sandrina Rendall Moreira Sá, Ênio José Bassi,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **29.08.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 30 de agosto de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Aos meus padrinhos, Alexandre Bonfim de Oliveira e Elcia Maria Araújo Bomfim pelo apoio, atenção e disponibilidade que me foi oferecida.

Aos meus pais, João Fernando Sá e Mª Verónica Rendall Moreira Monteiro Sá, pelos cuidados, amor, carinho e por terem confiado em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador, Niels Olsen Saraiva Câmara que abriu as portas do seu laboratório dando-me oportunidade para estagiar e, posteriormente, aceitou-me como aluna de mestrado. Agradeço pela confiança, atenção disponibilizada e apoio que me tem dado.

Ao professor Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader, por colocar a disposição o seu laboratório e me orientar nos experimentos feitos com as ilhotas pancreáticas.

Ao Ênio José Bassi, pela orientação, paciência e preocupação que teve comigo e com este trabalho.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Imunobiologia de Transplantes pelo apoio com os experimentos, transporte dos camundongos utilizados ao longo do trabalho e pela convivência.

A todos do Laboratório de Biofísica de Membrana pela disponibilidade de ensinar e cooperar com os experimentos.

Aos professores que me deram aulas pelos conhecimentos adquiridos, especialmente a professora Dr. Lourdes Isaac pela oportunidade de ser sua aluna PAE.

A secretaria de pós-graduação em Imunologia, em especial a Eni.

Ao Paulo Albe pela ajuda com a parte de analise histológica e paciência.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Imunologia, ao Instituto de Ciências Biomédicas e a Universidade de São Paulo por me acolherem.

Ao Napat da Costa pelo amor, companheirismo, carinho, amizade e muito apoio que me tem dado.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, muito obrigado.

RESUMO

Sá CSRM. Estudo da participação dos receptores do tipo *Toll-2* e *Toll-4* e da molécula adaptadora MyD88 no desenvolvimento do diabetes autoimune experimental. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O *diabetes mellitus* tipo 1 (DMT1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células beta pancreáticas. Durante o desenvolvimento de DMT1, macrófagos e linfócitos Th1 ativados secretam citocinas como IFN-γ, IL-1β, e TNF-α, que participam do processo inflamatório desencadeado na ilhota pancreática. Nos últimos anos, a participação de receptores do tipo *Toll* (TLRs) no desenvolvimento desta doença tem sido demonstrada, porém os mecanismos envolvidos neste processo ainda não foram totalmente elucidados. Neste projeto avaliamos o papel dos receptores da imunidade inata TLR-2 e TLR-4 e da molécula adaptadora MyD88 no desenvolvimento do DMT1 experimental induzido por múltiplas doses de estreptozotocina (MLD-STZ). A indução de DMT1 experimental foi realizada pela administração intraperitoneal de STZ (5 doses diárias consecutivas de 40 mg/kg) em camundongos C57BL/6 selvagem (WT), TLR-2, TLR-4 e MyD88 geneticamente deficientes (KO). O peso e a glicemia foram monitorados duas vezes por semana durante 21 dias. Após a eutanásia dos animais, a análise histológica do pâncreas foi realizada para quantificação do número de ilhotas, infiltrado celular inflamatório e expressão de Bcl-2, bax e caspase-3 clivada. O baço e linfonodos peri-pancreáticos foram analisados por citometria de fluxo para determinar a frequência de células T CD4+, CD8+, CD4+CD25+Foxp3+ (T reguladoras) e macrófagos. Testes estatísticos específicos foram aplicados e consideramos $p<0,05$ como tendo significância estatística. Foi observada uma maior severidade do DMT1 em animais TLR-2 KO, com maior glicemia e acentuada perda de peso quando comparado ao grupo WT. Além disso, maior infiltrado celular inflamatório, aumento da expressão de caspase-3 e diminuição no número de ilhotas foram observados no grupo de animais TLR-2 KO comparado ao grupo WT, sugerindo uma maior destruição das células β pancreáticas. De forma interessante, uma diminuição significante na frequência de células T reguladoras foi verificada no baço dos animais TLR-2 KO diabéticos quando comparados ao grupo WT. Estudos preliminares em ilhotas isoladas dos animais mostraram uma maior produção de óxido nítrico nos animais TLR-2 KO comparado ao WT. A deficiência do receptor TLR-2 resultou no desenvolvimento precoce e exacerbado do DMT1 experimental, sugerindo um importante papel para esse receptor da imunidade inata na modulação da resposta imune desenvolvida nesta doença.

Palavras-chave: Inflamação. TLR. Diabetes autoimune experimental.

ABSTRACT

Sá CSRM. The role of TLR-2, TLR-4 and MyD88 in the development of experimental autoimmune diabetes. [Masters theses (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Autoimmune type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by pancreatic beta cell destruction. During T1D development, several cytokines produced by activated macrophages and Th1 lymphocytes such as IFN-γ, IL-1β and TNF-α, have a role in the autoimmune inflammatory process in the pancreatic islet. Recently, the role of Toll-like receptors (TLRs) has been demonstrated in this disease; however the mechanisms involved in this process have not yet been fully explained. In this study, we evaluated the role of TLR-2, TLR-4 and MyD88 adaptor molecule in the development of experimental autoimmune diabetes induced by multiple low-doses of streptozotocin (STZ). Experimental autoimmune diabetes was induced by intraperitoneal administration of STZ (5 consecutive daily doses of 40 mg/kg) in C57BL/6 wild type (WT), TLR-2 KO, TLR-4 KO and MyD 88 KO mice. Body weight and glucose levels were monitored twice a week for 21 days. Histological analysis of the pancreas was performed to quantify the number of islets, inflammatory cellular infiltrate and immunohistochemistry for bcl-2, bax and caspase-3. The frequency of CD4+ cells, CD8+ cells, CD4+CD25+Foxp3+ (regulatory T cells) and macrophages (F4/80) in spleen and pancreatic lymph nodes were determined by flow cytometry. Interestingly, a more severe disease has been developed in diabetic TLR-2 KO mice, since higher blood glucose levels and a severe weight loss could be observed in these mice compared to WT group. Furthermore, both an increased inflammatory cellular infiltrate and caspase-3 expression could be detected in the pancreatic islets of diabetic TLR-2 KO group compared to the WT group, suggesting a greater destruction of β pancreatic cells. Interestingly, a significant decrease in the frequency of regulatory T cells was observed in the spleen of diabetic TLR-2 KO animals compared to the WT group 21 days after the first dose of STZ. Hence, TLR-2 receptor deficiency resulted in exacerbated development of experimental autoimmune diabetes, thereby suggesting an important role for this receptor of innate immunity in the modulation of the immune response developed in this disease.

Keywords: Inflammation. TLR. Experimental autoimmune diabetes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs: "*advanced glycation end-products*"

AKT: treonina quinase

APCs: células apresentadoras de antígeno

APC: "*Allophycocyanin*"

Bax: Bcl-2 associado a proteina X

Bcl-2: "*B-cell lymphoma 2*"

CBA: "*cytometric bead array*"

CDC: "*Center for Disease Control and Prevention*"

CD: "*Clusters Differentiation*"

DAF-FM: "*4-Amino-5-methylamino-2′,7′-difluorofluorescein*"

DCs: células dendríticas

dL: decilitro

DMT1: Diabetes Mellitus tipo 1

DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2

ELISA: "*enzyme-linked immunosorbent assay*"

Fas: proteína transmembrana

FasL: ligante de Fas

FID: Federação Internacional de Diabetes

FITC: "*fluorescein isothiacyanate*"

Foxp3: "*Forkhead Box P3*"

FSC: "*Forward scatter*"

GAD65: descarboxilase ácida glutâmica

Glut-2: transportador 2 de glicose

HE: Hematoxilina e Eosina

HMGB1: "*high-mobility group box 1*"

Hsp60: "heat-shock protein 60"

IA2: antígeno 2 do insulinoma

ICAM-1: molécula de adesão intracelular 1

IFN-γ: interferon-gama

IGF: fator de crescimento semelhante a insulina

IGTT: teste de tolerância á glicose intraperitoneal

IL-10: interleucina-10

IL-12: interleucina-12

IL-17: interleucina-17

IL-1β: interleucina-1β

IL-2: interleucina-2

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

i.p.: intraperitoneal

iNOS: "*Inducible nitric oxide synthase*"

IRAK: família de quinases associada ao receptor da IL-1

KO: "*Knockout*"

LPs: linfonodos pancreáticos

LFA-1: "*lymphocyte function-associated antigen 1*"

MLD-STZ: múltiplas doses de estreptozotocina

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MyD88: "*Myeloid differentiation primary response gene 88*"

mg: miligrama

NADPH: "*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*"

NF-kB: fator nuclear *kappa* B

NO: óxido nítrico

NOD: "*non-obese diabetic*"

PBS: solução salina de tampão fosfato

PE: "*ficoerythrin*"

PerCP: "*peridinin chlorophyll protein*"

pg: picograma

PI3K: fosfatidilinositol-3 quinase

SBF: soro fetal bovino

SPF: "*Specific Pathogen Free*"

STZ: estreptozotocina

TGF-β: fator transformador de crescimento–β

TLR: receptor do tipo *Toll*

TNF-α: fator de necrose tumoral α

Tregs: células T reguladoras

Trif*: "TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β"*

WT: selvagem

µl: microlitros

µM: micromolar

7AAD: 7-amino-actinomicina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Diabetes Mellitus (DM)..... 14
1.2 Fisiopatogenia do DM..... 15
1.3 Consequências do DM 16
1.4 Epidemiologia do Diabetes Mellitus do tipo 1 (DMT1)..... 17
1.5 O papel da resposta imune no DMT1 19
1.6 Receptores do tipo Toll (TLRs) e DMT1..... 20
2 OBJETIVO GERAL 25
2.1 Objetivo específico 25
3 MATERIAIS E METODOS 26
3.1 Animais de experimentação 26
3.2 Indução de DMT1 experimental..... 26
3.3 Teste de tolerância à glicose 26
3.4 Quantificação de proteínas pancreáticas..... 27
3.5 Análise histológica e imunohistoquímica..... 27
3.6 Citometria de fluxo 28
3.7 Quantificação de citocinas do soro 29
3.8 Quantificação de oxido nítrico pancreático..... 29
3.9 Isolamento de ilhotas pancreáticas..... 29
3.10 Ensaio de morte celular 30
3.11 Análise estatística dos dados 30
4 DESENHO EXPERIMENTAL..... 31
5 RESULTADOS 32
5.1 Desenvolvimento do DMT1 experimental..... 32
5.2 Teste de tolerância a glicose..... 33
5.3 Análise histológica do tecido pancreático..... 34
5.4 Expressão de Glut-2 nas ilhotas pancreáticas..... 38
5.5 Expressão de Bcl-2, Bax e caspase 3 nas ilhotas pancreáticas..... 39
5.6 Avaliação da presença de células imunes inatas nas ilhotas pancreáticas..... 45
5.7 Frequência de células imunes envolvidas no desenvolvimento de DMT1..... 49
5.8 Dosagem de citocinas 53
5.9 Quantificação indireta de oxido nítrico 55
5.10 Isolamento de ilhotas pancreáticas 56
5.11 Ensaio de morte de células das ilhotas pancreáticas..... 57
5.12 Quantificação indireta de oxido nítrico após o ensaio de morte das lhotas..... 59
6 DISCUSSÃO 60
7 CONCLUSÃO 64

REFERÊNCIAS 65
APÊNDICE - Artigo científico publicado..... 74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio autoimune (1, 2) crônico que abrange o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Ele se desenvolve no pâncreas. O pâncreas é constituído principalmente por dois tipos de tecidos: endócrino e exócrino. O tecido exócrino é constituído por ácinos cuja função é a secreção de suco digestivo no duodeno. O tecido endócrino descoberto em 1869 por Paul Langherans, também conhecido por ilhotas de Langherans, secreta insulina e glucagon diretamente no sangue. As ilhotas são constituídas por 4 tipos de células: α, β, δ e PP. As células α são produtoras de glucagon. As células β constituem a maior percentagem das células da ilhota, e são produtoras de insulina e amilina. As células δ produzem somatostatina e as células PP são secretoras de polipeptídio pancreático. O pâncreas é então considerado uma glândula anfícrina associada ao sistema digestório por produzir hormônios (insulina e glucagon) e enzimas importantes para a digestão de lipídeos, proteínas e carboidratos. A secreção defeituosa ou deficiente de insulina resulta na utilização inadequada de carboidratos que pode levar a hiperglicemia e ao desenvolvimento do diabetes (3, 4).

Diabete Mellitus do tipo I (DMT1) se desenvolve como consequência da destruição das células β nas ilhotas pancreáticas causando uma deficiência grave ou a ausência absoluta de insulina. A destruição das células β geralmente é devido à autoimunidade, associada à susceptibilidade genética e/ou agressão ambiental (3). O DMT1 é mais freqüente na infância e costuma manifestar-se geralmente abaixo dos 30 anos de idade, concentrando-se no período escolar e na adolescência (5).

No Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) ocorre redução da sensibilidade à insulina, e, consequentemente, ocorrem distúrbios no armazenamento de carboidratos e elevação da glicemia. Na tentativa de controlar essa hiperglicemia, o pâncreas aumenta cada vez mais a produção de insulina. O DMT2 é muitas vezes acompanhado de obesidade e síndrome metabólica (4). Esta doença é mais observada em adultos e a sua frequência tem crescido entre crianças obesas (5).

1.2 Fisiopatogenia do DM

Em alguns casos, o DM precede algumas doenças que acarretam na destruição de ilhotas pancreáticas como, por exemplo: pancreatite, tumores ou doenças genéticas; ou pode surgir também secundariamente ao uso de certos fármacos, ao excesso de ferro, a certas cirurgias e a endocrinopatias. O DMT2 pode ser relacionado também a fatores ou doenças como a síndrome de ovário policístico e a formação excessiva de glicocorticóides (4).

Em relação ao ambiente natural, alguns estudos demonstraram que a baixa densidade populacional e o ambiente rural estão associados a0 menor aparecimento de diabetes (6). Paralelamente, as infecções por vírus de sarampo, citomegalovírus, rubéola, mononucleose infecciosa, caxumba e vírus coxsackie também podem elevar o risco de desenvolvimento do DM, por ocasionar lesões teciduais ou por induzir tropismo às células β pancreáticas. Em alguns casos, pode ocorrer mimetismo molecular, ou seja, podem existir proteínas virais que apresentam sequencias de aminoácidos semelhantes a proteínas das células β, induzindo ativação de células imunes capazes de desencadear respostas contra essas proteínas, levando a uma destruição das células β de ilhotas de Langherans (7 , 8, 9.). Em adição, toxinas químicas como a estreptozotocina, aloxana, pentamidina e vacor (raticida) causam destruição direta ou indireta das células β. Esta destruição indireta ocorre através de ativação autoimune capaz de destruir estas células levando ao desenvolvimento do DMT1 (10, 1, 3).

O DMT2 está intimamente associado a obesidade, excesso de adiposidade visceral, excesso de glicocorticóides ou de hormônios de crescimento (acromegalia), gestação e doença de ovário policístico. Em adição, está também ligado à presença de auto-anticorpos direcionados ao receptor de insulina, mutações do receptor de insulina, mutações que cursam com obesidade genética e lipodistrofia genética e às algumas doenças hereditárias (causadoras de acúmulo de ferro no tecido) (4, 11.). Por fim, de acordo com alguns estudos, a ativação crônica do sistema imune acompanhado de aumento de marcadores de inflamação (IL-6 e proteína C reativa) foi altamente associada ao desenvolvimento do DMT2 na população americana (12, 13).

1.3. Consequências do DM

O DM em humanos pode apresentar complicações como: nefropatia, retinopatia, doenças cardiovasculares, neuropatias, entre outras (14). O processo inflamatório desencadeado no DM contribui significantemente para o aumento na expressão de moléculas de adesão e extravasamento sanguíneo na retina causando perda de visão ou até cegueira (15, 16, 17). Por outro lado, são observados formação e depósito de imunocomplexos, produção de quimiocinas e migração de células inflamatórias em nefropatias de pacientes com DMT1 e DMT2 (18, 19, 20). Alguns autores estudaram os mecanismos envolvidos com as complicações do DM. Um dos mecanismos observados, foi a alta produção de AGEs (*advanced glycation end-products*) associada a hiperglicemia. Os AGEs causam alterações qualitativas e quantitativas nos compostos da matriz extracelular (colágeno V, laminina e vitronectina), podendo alterar a proliferação celular. Adicionalmente, os AGEs induzem alterações que afetam a adesão, o crescimento e função celular, principalmente de macrófagos e monócitos, por interagirem com receptores específicos, tendo efeito pró-oxidante/inflamatório nos diabéticos (21, 22). A hiperglicemia observada no DM, segundo alguns estudos, está diretamente relacionada a complicações macrovasculares, como doenças coronarianas (23-25), por estimular a ativação de plaquetas e o aumento de expressão de integrinas. Uma vez ativadas, as plaquetas irão expressar moléculas de ativação, entre elas, P-selectinas e CD40L. De fato, pacientes diabéticos apresentam elevada expressão de glicoproteínas (GP) Ib e GP IIB/IIIa, que medeiam a ligação do fator de Von Willebrand ao complexo plaqueta-fibrinogênio (26-28).

Segundo Serbedžija et al. a hiperglicemia severa associada à diminuição de insulina e do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) está relacionada a atrofia cerebral e ao comprometimento de atividades cognitivas nos pacientes diabéticos (29**)**. Outros autores têm demonstrado a existência de menor massa óssea nos esqueleto axial e apendicular como consequência do diabetes (30, 31).

1.4 Epidemiologia do DMT1

O DMT1 é um importante problema de saúde pública mundial, onde o número de pacientes com DM (tipo I ou tipo II), segundo a Federação Internacional de Diabetes (FID), é estimado em aproximadamente 371 milhões de pessoas (Tabela 1). Além disso, no ano de 2025, conforme estimativas da FID, este número de pessoas deverá aumentar para 380 milhões. A incidência mundial de DM é muito variável, podendo atingir valores como 36 casos/100.000 indivíduos em países/cidades como Finlândia e Sardenha (32). Ademais, metade de toda a população diabética não é diagnosticada. No caso do DMTI, estima-se um aumento anual de 3,2% no número de casos, principalmente entre crianças e adolescentes (33). Nos Estados Unidos, estima-se que 20 milhões de pacientes sejam diabéticos (7% da população), sendo que 5-10% dos casos correspondem ao DMTI, segundo informações do CDC ("Center for Disease Control and Prevention") (5, 34). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, no ano de 2005, o número estimado de pacientes com DM (tipo I e tipo II) foi de 8 milhões de casos. Além disso, a prevalência anual de DMTI no país é de aproximadamente 8 pacientes a cada 100 mil indivíduos (35).

Tabela 1- Epidemiologia do desenvolvimento do diabetes segundo a Federação Internacional do Diabetes, 2012 (Adaptado da referência 35).

Continentes	Nº de pacientes diabéticos	% de pacientes não diagnosticado	% de prevalência do diabetes	Observação
América do Norte e Caribe	38 milhões	29,2	10,5	1 em cada 10 adulto é diabético
Centro e Sul de América	26 milhões	45,5	9,2	1 em cada 11 adulto é diabético
Médio Leste da Ásia e Norte de África	34 milhões	52,9	10,9	1 em cada 9 adulto é diabético
Centro e Sul da África	15 milhões	81,2	4,3	Alta taxa de mortalidade por diabetes
Europa	55 milhões	38,6	6,7	21,2 milhões de pessoas são diabéticos, mas não sabem.
Sudeste da Ásia	70 milhões	51,1	8,7	Em cada 5, 1 pessoa não é diagnosticada; em cada 4 mortes, 1 é por DM.
Oeste Pacífico	132 milhões	57,9	8	1 em cada 3 adultos é diabético; as Ilhas Pacíficas é o 6º país entre os 10 países de maior prevalência do DM.

Segundo dados de 2012, foram gastos mais de 471 bilhões de dólares americanos com cuidados de saúde a diabéticos. Os dados de 2005 mostraram que o número de óbitos devido o DM atingiu 6% do total de mortes no mundo, associado principalmente a doenças cardiovasculares (50% dos casos) (36). Em 2012, 4.8 milhões de pessoas morreram em conseqüência direta ou indireta do DM no mundo (37).

1.5 O papel da resposta imune no DMT1

O DMTI é uma doença ocasionada por resposta autoimune com um perfil de ativação de células T $CD4^+$ do tipo Th1. Durante o desenvolvimento da doença, ocorre a infiltração de células T $CD4^+$, $CD8^+$, linfócitos B e macrófagos, que resulta num processo inflamatório denominado insulite (38, 39). Macrófagos e células dendríticas (DCs) são as primeiras células a infiltrar as ilhotas, e têm papel crucial na migração e diferenciação de linfócitos T. DCs podem iniciar e regular a resposta imune, sendo capazes de exacerbar ou inibir a inflamação e a autoimunidade. Estudos em humanos e animais sugerem que DCs estejam envolvidas no desencadeamento do DM autoimune. Elas foram encontradas na proximidade de células β do pâncreas de pacientes diabéticos e em camundongos NOD após a insulite. De acordo, DCs mielóides seriam as relacionadas à indução da doença em camundongos NOD (40).

Linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ participam da patogênese reagindo principalmente contra auto-antígenos expressos nas células β do pâncreas causando a lise destas células ou induzindo a apoptose por meio da ação de citocinas ou moléculas como perforinas e granzimas (41, 42). Linfócitos T $CD4^+$, após a diferenciação para Th1, produzem citocinas como interleucina-1β (IL-1β), interferon-gama (IFN-y) e fator de necrose tumoral (TNF), que induzem a apoptose das células β pancreáticas (42). A ativação dos linfócitos T $CD4^+$ auto-reativos requer a apresentação de auto-antígenos através de moléculas MHC de classe II. Em condições normais, as células β não expressam moléculas de MHC classe II (43). Contudo, no processo autoimune, auto-antígenos provenientes de células β são apresentados por células apresentadoras de antígeno (APCs) a células T näive auto-reativas nos linfonodos pancreáticos. Paralelamente, no endotélio de alguns vasos nas ilhotas também ocorre um aumento da expressão de moléculas de adesão proporcionando, por fim, a infiltração mononuclear.

Durante a patogênese do DMT1, o reconhecimento de auto-antígenos na superfície de células β através da expressão de MHC classe I ativa a indução de apoptose às mesmas por células T $CD8^+$. Já a apresentação de antígenos por APCs (via MHC classe II) a células T $CD4^+$ na proximidade das ilhotas resulta na destruição de células β via a liberação de citocinas e mediadores solúveis de morte celular produzidas por linfócitos T e radicais livres produzidos por macrófagos (44). Citocinas como TNF e IFN-

γ induzem nas células β a expressão de moléculas de adesão-1 (ICAM-1) e moléculas como o antígeno associado à função linfocitária (LFA-1). Já a citocina IL-1β, por sua vez, induz a expressão da enzima oxido nítrico sintase, ativando a síntese de oxido nítrico (NO) e radicais livres de oxigênio, causando assim a morte celular (45).

Além da imunidade celular, pacientes diabéticos também podem produzir auto-anticorpos específicos ou relacionados à doença, como por exemplo, anticorpos anti-insulina, anti-antígeno 2 do insulinoma (anti-IA2) e anti-descarboxilase ácida glutâmica (anti-GAD65) (58). Auto-anticorpos podem ativar a resposta imune através do sistema complemento ou, por meio de opsonização potencializando a apresentação de auto-antígenos por APCs. Estes anticorpos são encontrados em maior quantidade principalmente em crianças do sexo masculino, sendo menos freqüentes em adultos (47). Entre adolescentes é comum observar anticorpos anti-IA2, um indicador de progressão rápida da doença. Além disso, o anti-GAD65 pode persistir após o pico da doença e está associado ao DMT1 e outras doenças de natureza auto-imune (48).

1.6 Receptores do tipo *Toll* (TLRs) e o DMT1

O envolvimento dos TLRs na imunidade inata foi descrito inicialmente em moscas do gênero *Drosophila* em 1990, sendo depois identificado em mamíferos um homólogo deste receptor (49). Esta família consiste de 10 tipos diferentes de receptores em humanos e 13 em camundongos, sendo 9 destes receptores mais descritos na literatura. Os TLRs encontram-se localizados na superfície celular (TLR-1, 2, 4, 5 e 6) e no meio intracelular (TLR-3, 7, 8 e 9) (50). Estes receptores são considerados sensores da imunidade inata sendo encontrados principalmente na superfície de DCs e macrófagos podendo reconhecer uma infinidade de moléculas como lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas, flagelina, proteínas de fungos, glicolipídeo de parasitos e ácidos nucléicos virais, entre outros (51 - 53). Além disso, ligantes endógenos também são capazes de promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias por monócitos e macrófagos, através da via de sinalização dos TLRs (54). A ativação destes receptores pode levar à ativação de diferentes cascatas intracelulares que resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias, no aumento da capacidade fagocítica a patógenos e na expressão de moléculas co-estimuladoras em APCs (52, 53).

O primeiro membro da família dos TLRs identificado em mamíferos foi o TLR-4, na membrana plasmática de macrófagos em 1998, estando envolvido no reconhecimento de LPS, um importante componente da parede celular de bactérias gram-negativas (51). Com o reconhecimento do LPS pelo TLR-4, inicia-se uma cascata de sinalização intracelular por meio da molécula adaptadora Myd88 resultando na ativação do fator nuclear kappa B (NF-*k*B) e promovendo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (55). A estimulação do TLR-4 também induz uma outra cascata de sinalização por meio da molécula adaptadora TRIF resultando na produção do IFN-β (56).

Com a estimulação do TLR-2, é ativado uma cascata de sinalização através de MyD88 resultando em ativação do NF-kB e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF e IL-6) e/ou anti-inflamatória (IL-10, TGF-β) (57-59). Inicialmente, o TLR-2 foi relacionado com o reconhecimento de LPS, e pesquisas posteriores concluíram que este receptor poderia reconhecer uma variedade maior de componentes microbianos, cooperando com outros TLRs como, por exemplo, TLR-1 e TLR-6, induzindo a produção de TNF (60). Por fim, tanto TLR-2 como TLR-4 estão presentes nas APCs e após sua ativação podem induzir a proliferação de células T CD4+ (61).

A sinalização por TLRs em APCs, de acordo com o ligante, pode levar a um balanço entre uma resposta do tipo Th1/Th2 proporcionado assim, diferente respostas imunes em animais diabéticos. Estudos mostram que LPS de *Escherichia coli* é capaz de ativar TLR-4 em DCs resultando na produção de IL-12 com a estimulação de linfócitos T $CD4^+$ do tipo Th1 e ativação de células T citotóxicas. Já zimozan, um agonista de TLR-2, pode ativar DCs, estimulando a produção de IL-10 e uma resposta do tipo Th2 (62). Corroborando estes dados, estudos por Wenink et al. *(*2009) mostraram que TLR-2 pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por TLR-4 e TLR-7/8 (IL-12p70) em DCs humanas. Além disso, esta também pode ativar fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) que inibe a produção de TNF, aumentando a resposta imune de perfil Th2 e TH17 (63).

Estudos em modelos experimentais mostraram uma possível conexão entre TLRs e o desenvolvimento de DMT1. De forma interessante, Wen *et al.* (2008) mostraram que camundongos NOD, deficientes para molécula adaptadora Myd88 (Myd88 KO), quando mantidos em ambiente livre de patógenos (*germ-free*) desenvolveram DMT1 de forma acentuada. Entretanto, quando estes foram mantidos em condições livres de patógenos

específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*), os mesmos não desenvolveram a doença, mostrando a importância da interação da microbiota com o sistema imune inato à predisposição ao DMT1 (64).

O tratamento simultâneo com agonistas de TLR-4 e TLR-3 foi descrito a estimular a produção de citocinas imunossupressoras como IL-10, TGF-β e a expansão de células T reguladoras (Treg), em experimentos *in vivo* e *in vitro*, além de suprimir o desenvolvimento de diabetes autoimune e asma em camundongos NOD (65). Em concordância, estudos também têm relacionado o aumento da expressão de TLR-2 e -4 e ativação de vias de sinalização referentes a TLRs no DMT1 (64). Recentemente mostrou-se que o receptor TLR-2 pode tanto exacerbar ou como prevenir o início da DMT1, iniciando uma resposta imune "equilibrada" incluindo tanto componentes pró-inflamatórios como antiinflamatórios. Assim, agonistas de TLR-2 tem o potencial de induzir citocinas supressoras e aumentar a funcionalidade de células Treg. A exposição de APCs de camundongos NOD ao zimozan resultou na liberação de IL-10, TGFβ-1, IL-2 e TNF. O tratamento de camundongos pré ou hiperglicêmicos com zimozan resultou ainda na supressão da insulite acompanhado de um atraso significante no desenvolvimento da doença. Os linfócitos T destes camundongos tratados apresentaram uma capacidade reduzida de induzir diabetes em camundongos *NOD-Scid*. O tratamento ainda foi associado a um aumento da função supressora de células Treg (57).

Em outro estudo, foi mostrado que a sinalização promovida pelo TLR-2 pode induzir em DCs do baço a metabolização do ácido retinóico pela enzima retinaldeído desidrogenase tipo 2 e interleucina-10 (IL-10). O ácido retinóico por sua vez age nas DCs induzindo a supressão da expressão de Socs-3 (proteína supressora sinalizadora-3), suprimindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (58). De acordo com esses resultados, a sinalização via TLR-2 pode induzir células Treg e suprimir células Th17, sendo um importante mecanismo de supressão de autoimunidade.

As células β do pâncreas expressam os receptores TLR-2, TLR-4, CD14 e a molécula MD-2. Ensaios, *in vitro*, utilizando estas células demonstram que o LPS pode regular a secreção de insulina de modo glicose-dependente e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF (66). Além disso, as células β também podem se adaptar a situações endotóxicas e inflamatórias que ocorrem durante o diabetes. As ilhotas pancreáticas expressam TLR-2, -3, -4 e -9 e em contato com os

ligantes a expressão de TLR-2 e -4 é aumentada (67). Paroni et al. (2009) identificaram o TLR-4 como sendo o receptor de CXC10 (quimiocina de linfócitos Th1) e sinalizador de apoptose nas células β. Neste estudo, também mostraram que CXC10 por meio de MyD88, ativa a proteína fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e serina/treonina quinase (AKT) levando a apoptose celular (68).

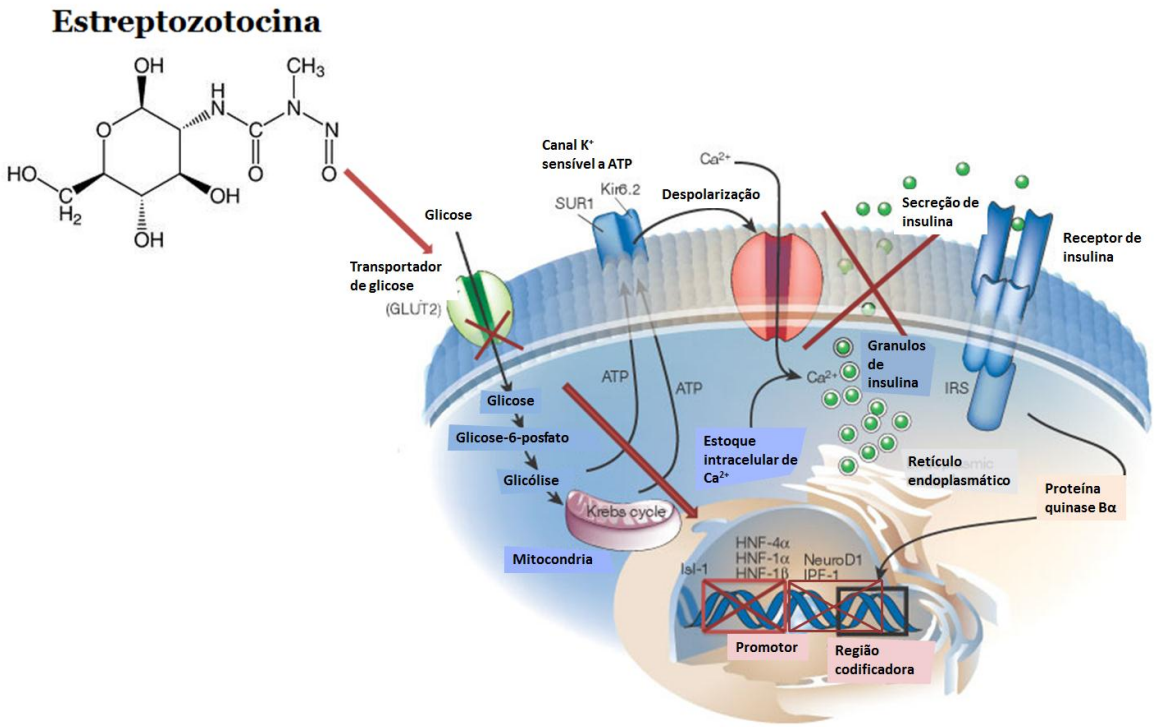
Em humanos, verificou-se um aumento na expressão de TLR-2 e TLR-4 nos monócitos de pacientes DMTI. Além disso, um aumento nos níveis de ligantes para TLRs na circulação sanguínea como endotoxina, Hsp60 (do inglês, heat-shock protein 60) e HMGB1 (do inglês, high-mobility group box 1) foi observado (54). Foi verificado também nestes pacientes um aumento na expressão de MyD88, Trif, NF-kB, IRAK e receptor de IL-1, componentes da via de sinalização de TLR-2 e -4, resultando na produção elevada das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF e IL-6 (59).

O fator de transcrição NF-kB, pertencente à cascata de sinalização dos TLRs, pode ser um ativador de apoptose em células β. Em camundongos transgênicos que expressam a proteína inibidora específica deste fator de transcrição, as células β mostraram-se resistentes *in vitro* a efeitos deletérios de IL-1β e IFN-γ, verificado por uma reduzida produção de NO e apoptose nas ilhotas pancreáticas. Nestes animais, no modelo de DMT1 induzido por múltiplas doses de estreptozotocina (MLD-STZ), observou-se ainda uma proteção das ilhotas pancreáticas e uma significante redução do infiltrado celular mononuclear (69). Estes resultados indicam portanto que a resposta inflamatória iniciada pela sinalização por TLRs pode estar envolvida no mecanismo de apoptose das células β no DMT1.

Um modelo experimental muito utilizado para o estudo do DMT1 consiste na administração de múltiplas doses de estreptozotocina (5 doses de 40mg/kg administradas intraperitonealmente)(MLD-STZ) em camundongos C57BL/6 (10, 1). A estreptozotocina se liga no transportador de glicose, Glut 2, impedindo a entrada de glicose e destrói o DNA das células β pancreáticas, resultando na morte das mesmas (70, 71)(Figura 1). Neste modelo, os macrófagos são as primeiras células que infiltram as ilhotas pancreáticas e citocinas como IFN-γ, IL-1β, TNF e IL-6 estão envolvidas no desenvolvimento do processo inflamatório. A doença é induzida por linfócitos T CD4+ de perfil Th1 que secretam moléculas efetoras solúveis que ativam macrófagos promovendo a destruição das células β (1). Além disso, a indução de apoptose nas células

β também está relacionada à ação do radical livre NO e espécies reativas de oxigênio (ROS) (68).

Figura 1- Representação esquemática do efeito da estreptozotocina nas células β pancreáticas.



Representação esquemática do efeito da estreptozotocina nas células β pancreáticas. (Figura adaptada de: commons.wikimedia.org e nature.com) (70, 71).

Diante as atuais descobertas descritas anterioremente, propomos, neste trabalho, que os receptores do tipo TLR-2 e -4 e a molécula adaptadora MyD88 participem ativamente do processo de insulite, orquestrando os eventos iniciais, determinantes para a destruição de ilhotas β pancreáticas. Para elucidar esta hipótese, trabalhamos com um modelo clássico de DMT1 experimental e avaliamos sua patogênese em animais geneticamente modificados para as vias citadas.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação dos receptores da imunidade inata TLR-2 e TLR-4 e da proteína adaptadora MyD88 no desenvolvimento do diabetes auto-imune experimental.

2.1 Objetivos específicos

Utilizando o modelo de DMT1 experimental em animais WT e TLR-2, -4 e MyD88 KO, estudamos:

a) O fenótipo clínico do diabetes ao longo de 21 dias;

b) O processo inflamatório (citocinas e perfil celular) sistêmico, local e periférico após a indução do diabetes; e

c) As vias apoptóticas envolvidas neste modelo.

Uma vez mostrada uma diferença na susceptibilidade ao DM nos animais geneticamente modificados, reproduzimos *in vitro* a lesão celular no intuito de:

a) Avaliar a sensibilidade ou resistência de células β pancreáticas isoladas de animais WT e TLR-2, -4 e MyD88 KO a morte celular após ativação celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

No desenvolvimento do projeto foram utilizados camundongos C57BL/6 obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos da USP e KO obtidos do Biotério da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME). Foram utilizados camundongos WT, TLR2 KO, TLR4 KO e MyD88 KO de idade variável entre 9-12 semanas. Antes e após os procedimentos cirúrgicos, os camundongos foram acondicionados em micro isoladoras coletivos, contendo no máximo cinco animais, supridos de água e alimento autoclavados *ad libitum*. Estes animais foram submetidos a ciclo artificial claro/escuro de 12 horas e com uma temperatura ambiente constante de 22 ºC. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética do ICB, USP (Nº110/2011).

3.2 Indução de DMT1 experimental

Para indução do DM autoimune experimental foi utilizado o protocolo de múltiplas doses de estreptozotocina (MLD-STZ) conforme descrito por Karabatas et al. (2005) (107). Nos camundongos C57BL/6, TLR2 KO, TLR4 KO e MyD88 KO foram injetados por via intraperitoneal 40 mg/kg de estreptozotocina (Sant Louis, Missouri, USA), durante 5 dias consecutivos, dissolvida em tampão citrato (0,1 mol/L citrato de sódio; 0,1 mol/L ácido cítrico; pH= 4,5) após 6 h de jejum. Para o acompanhamento da doença, o peso e a glicemia foram monitorados duas vezes por semana durante 21 dias. Os animais considerados diabéticos apresentaram duas vezes consecutivos uma glicemia maior do que 200 mg/dL.

3.3 Teste de tolerância à glicose

Após 8-12 horas de jejum, foi realizado o teste de tolerância a glicose (TTG) nos animais diabéticos e controle (normoglicêmicos). A solução de glicose foi administrada na cavidade peritoneal na concentração de 1,5 mg/g de massa corporal. A glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose (tempo 0) e 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a

administração. A coleta de sangue foi feita a partir da extremidade da cauda de cada animal nos determinados períodos de tempo e a glicemia (mg/dL) foi determinada utilizando o glicosímetro *Accu-Check Advantage* II (Roche, Mannheim, Alemanha).

3.4 Quantificação de proteínas pancreáticas

Para a quantificação de proteínas pancreáticas, um fragmento tecidual do pâncreas (aproximadamente 50 g) foi homogeneizado em 1 ml de tampão RIPA (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) contendo inibidores de proteases (Complete Mini EDTA-free cocktail, Roche), utilizando-se um homogeneizador de amostras (Polytron). As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4 °C, sendo a concentração de proteínas totais determinada pela metodologia de Bradford (*DC protein assay*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) nos sobrenadantes obtidos após a centrifugação. A quantificação de citocinas no homogenato tecidual foi realizada utilizando a metodologia de CBA (*Cytometric Bead Array*) conforme recomendações do fabricante (BD Biosciences, San Jose, Estados Unidos).

3.5 Análise histológica e imunohistoquímica

O pâncreas dos animais foi processado para análise histológica (coloração hematoxilina-eosina) avaliando-se a presença de infiltrado celular (insulite) ou destruição de ilhotas pancreáticas. O grau de insulite foi determinando baseando-se no estudo de Emre Y e colaboradores (72) utilizando-se os “escores”: 0 - ausência de infiltrado inflamatório; 1 - infiltrado celular <50 %; e 2 – > 50 – 100 %. Além disso, a expressão de proteínas anti e pró-apotóticas (Bcl-2 e Bax respectivamente), caspase-3, transportador 2 de glicose (Glut-2), mieloperoxidase e CD11b foram verificadas pela técnica de imunohistoquímica. Foi utilizado anticorpo anti-Bcl-2 (diluição 1:500; D17C4, Cell Signalling, Danvers, EUA), anti-Bax (diluição 1:200; Cell Signalling) anti-caspase 3 (diluição 1:200; Asp175, Cell Signalling), anti-Glut-2 (diluição 1:1000; Millipore, Billerica, EUA), anti-mieloperoxidase (diluição 1:200; Daco, Glostrup, Dinamarca) e anti-CD11b (diluição: 1:400; Abcam, Cambridge, EUA). Para o desenvolvimento da reação foi utilizado o kit Envision Dual Link System-HRP (Dako), de acordo com

recomendações do fabricante. Após a reação, foi realizada a contra coloração das lâminas pela coloração HE.

3.6 Citometria de fluxo

Nos camundongos, foram isolados linfonodos peri-pancreáticos e o baço para preparação de uma suspensão celular em PBS. A suspensão celular foi incubada com os anticorpos monoclonais específicos (CD4, CD25, CD8, CD11b, F4/80, Foxp3, todos adquiridos da Biolegend, San Diego, EUA), previamente conjugados aos fluorocromos FITC, PE, PercP, *Pacific blue* ou APC. A seguir, os tubos foram incubados na geladeira por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 ml de tampão FACS (PBS + 5 % SBF + NaN3 1 mg/ml (0,1 %)) aos tubos e os mesmos centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos à 4 ºC. O sobrenadante foi desprezado e os *pellets* foram misturados no vortex por 5 segundos para desprender as células. Foi adicionado 0,5 ml de tampão FACS em cada tubo com imediata centrifugação à 1500 rpm por 5 minutos à 4 ºC. Após desprezar o sobrenadante, 300 µl de tampão FACS foi adicionado em cada tubo. Para a determinação da freqüência de células T reguladoras, inicialmente a marcação das moléculas de superfície foi realizada incubando 1 x 10^6 células por 30 minutos a 4 °C na presença dos anticorpos CD4 (PerCP) e CD25 (FITC). Após a incubação, 500 µl de tampão FACS foram adicionados as amostras e as mesmas centrifugadas a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e os tubos foram agitados no vortex por 5 segundos para o desprendimento das células. A marcação do fator de transcrição intracelular Foxp3 foi então realizada utilizando-se o kit APC *anti-mouse/rat Foxp3 staining* (eBioscience, San Diego, EUA), conforme recomendações do fabricante. Após a marcação, as células foram suspendidas em 300 µl de tampão FACS e 80.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo (FACSCanto II). Para as análises do experimento, foi desenhado um gate selecionando a população de interesse. No *gate* selecionado, um gráfico de FSC-H/ FSC-A foi construído para retirar os dobles e, em seguida, essa população foi analisada de acordo com as marcações que nela foram feitas.

3.7 Quantificação de citocinas do lisado pancreático e soro

A quantificação das citocinas IL-1β, IL-12p70 e TGF-β no lisado pancreático foi realizada pelo método de ELISA, conforme as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EUA). A normalização entre as amostras foi realizada utilizando-se a quantidade de proteína total tecidual, determinada pela metodologia de Bradford (DC protein assay, Bio-Rad).

As citocinas IFN-γ, IL-17, IL-2, IL-4 e IL-6 foram quantificadas no soro e no extrato pancreático pela metodologia de CBA seguindo as instruções do fabricante (Mouse CBA Th1/Th2/Th17 Kit, BD Biosciences, EUA). Os resultados foram determinados em (pg)/mg de proteína total. Para análise dos dados foi utilizado o software *FCAP Array* (BD Biosciences).

3.8 Quantificação de oxido nítrico (NO) pancreático

Para a quantificação indireta de NO no homogenato pancreático foi utilizada a técnica de Griess. Para tal, inicialmente as amostras (n=3) foram centrifugadas a 13.200 rpm por 15 min a 4 °C. Foi utilizado 50 uL de sobrenadante translucido da amostra e 50 µL do reagente de Griess previamente preparados conforme as orientações do fabricante (Sigma-Aldrich). A seguir a amostra foi incubada com o reagente de Griess ou PBS (controle negativo da reação de Griess) durante 10 minutos. Após a incubação foi feito a análise da amostra no leitor de Elisa em comprimento de onda: 450 e 570 nm, descontando os valores obtidos do controle negativo. As concentrações finais de NO, obtidas pela técnica foram normalizados pela quantidade de proteína total obtida do lisado pancreático.

3.9 Isolamento de ilhotas pancreáticas

Para o isolamento de ilhotas pancreáticas, bloqueou-se a saída do duto pancreático para o intestino e injetou-se 2,5 ml de colagenase do tipo IV (Sigma-Aldrich, Alemanha) via uma agulha (30 G, BD Biosciences) na região de união do ducto

pancreático com o colédoco. Depois de removido, o pâncreas foi cortado em pequenos fragmentos em um tubo cônico de 15 mL contendo 2 mL de colagenase (tipo IV) seguido de incubação a 37 ºC por 20 minutos. A seguir, o excesso de tecido exócrino foi retirado pela adição de solução de Hank's por 4 vezes consecutivas. As ilhotas foram então colocadas numa placa de Petri de fundo preto, para facilitar a visualização sob uma lupa. As ilhotas foram separadas ("*picking*") utilizando-se uma pipeta de 10 microlitros. Em seguida as ilhotas foram então transferidas para o meio de cultura (RPMI) e cultivadas durante 48 horas (73).

3.10 Ensaio de morte celular

Após o isolamento de ilhotas de camundongos WT e TLR-2 KO não diabéticos, as ilhotas foram estimuladas com um coquetel de citocinas constituído de 0,4 ng/ml de IL-1β + 2 ng/ml de IFN-γ, para mimetizar uma resposta imune inflamatória *in vivo*. Após 3 dias de tratamento, o sobrenadante foi coletado para quantificação de nitrito pelo método de Griess e as ilhotas foram dispersas para marcação com anexina V e 7AAD seguindo as orientações do fabricante (Invitrogen, EUA). Além disso, a suspenção obtida também foi marcada com DAF-FM Diacetato para análise intracelular citoplasmática de NO, desenvolvido por Kojima e colaboradores, segundo as instruções do fabricante (Molecular Probes, EUA)(74, 75).

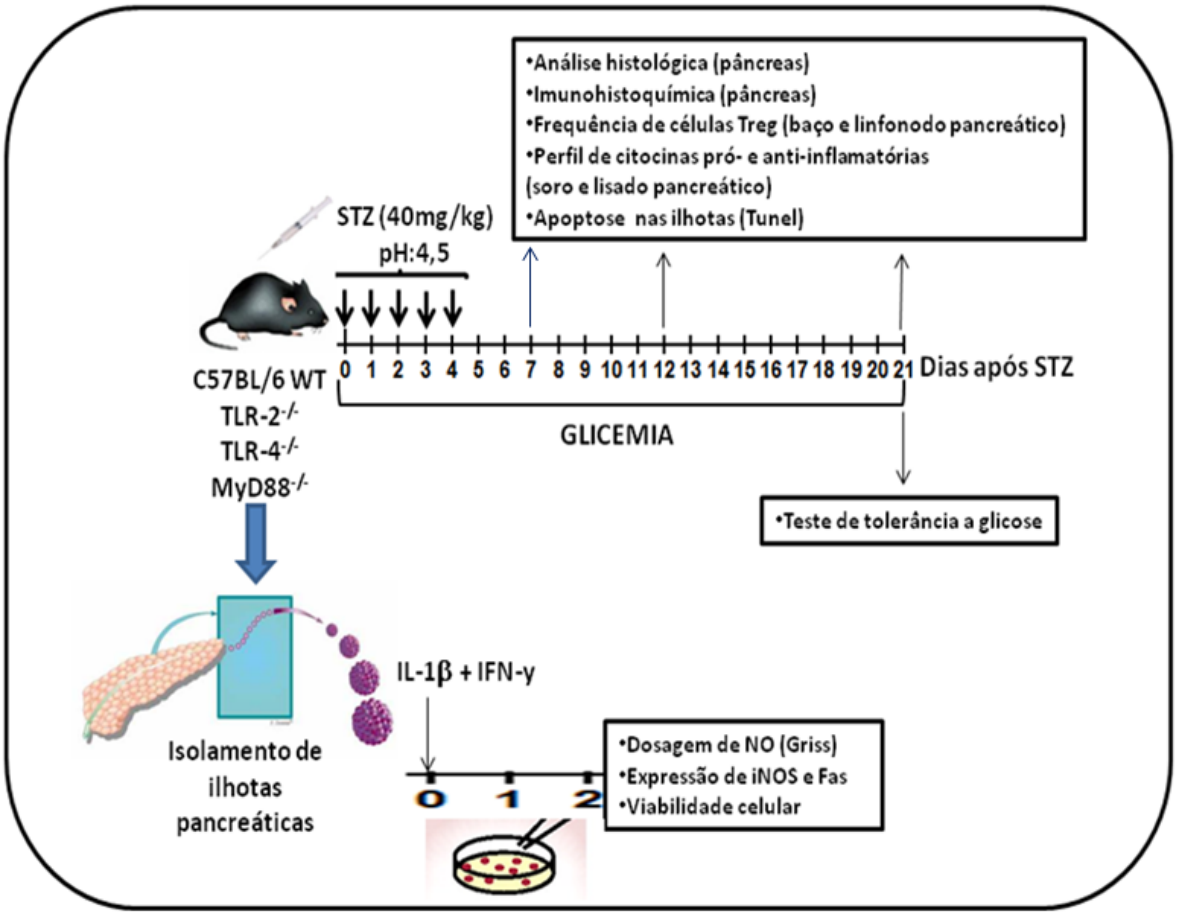
3.11 Análise estatística dos dados

Para a comparação entre dois grupos experimentais utilizamos o teste T de *Student* e para a comparação entre vários grupos, o teste de Anova, com correção o teste de Bonferroni. A apresentação dos resultados foi expressa na forma de média ± desvio padrão. Foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p<0,05$. Para as análises, foi utilizado o software Graphpad Prism 5.

4 DESENHO EXPERIMENTAL

Para alcançar os objetivos propostos, o projeto foi delineado conforme desenho abaixo (Figura 2).

Figura 2- Representação esquemática no trabalho.



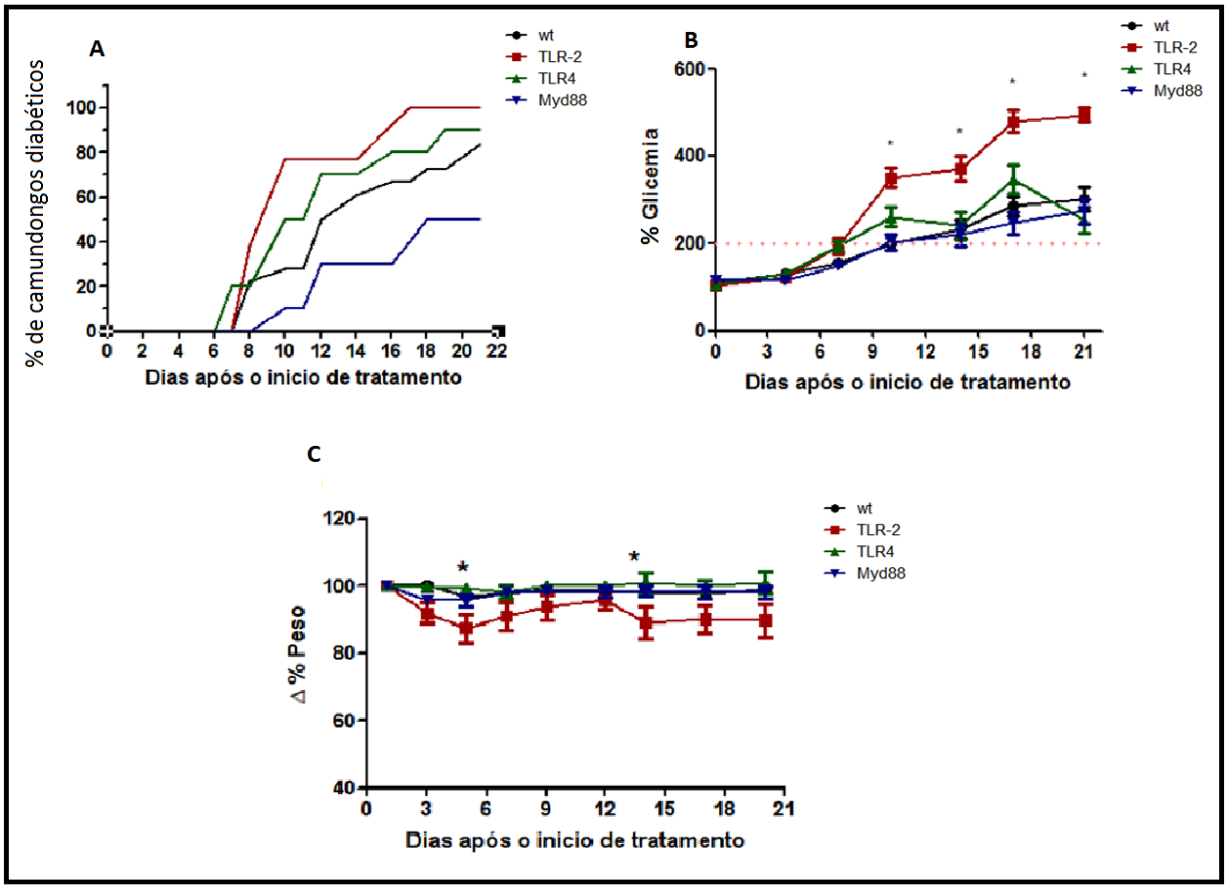
Representação esquemática do trabalho. Os camundongos foram tratados com 5 doses baixas de STZ e após 7, 12 e 21 dias foram feitas análises histológicas, imunohistoquimicas, frequência célular e dosagem de citocinas. Durante 21 dias monitorou-se a glicemia (2 x /semana), e no final foi realizado teste de tolerância à glicose. Dos camungondos não tratados foram isoladas ilhotas, estas foram tratadas com IL-1β+IFN-γ (*in vitro* por 72 horas) seguido de analise a viabilidade celular e quantificação de NO.

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento do DMT1 experimental

No intuito de aplicar a hipótese do trabalho *in vivo*, DMT1 foi induzido administrando 5 doses consecutivas (1 dose/dia) de estreptozotocina (STZ) em camundongos C57BL/7 WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO. Inicialmente foi analisado o perfil de desenvolvimento de DMT1 (Figura 3A), em seguida o grau de hiperglicemia (Figura 3B) e perda de peso (Figura 3C) dos animais após a indução de DMT1. Os camundongos cuja glicemia foi maior que 200 mg/dl por duas medidas consecutivas foram considerados diabéticos. Após a indução de DMT1, 83,33% dos WT, 100% dos TLR-2 KO, 90% dos TLR-4 KO e 50% dos MyD88 KO desenvolveram diabetes (Figura 3A). Os camundongos TLR-2 KO apresentaram níveis significantemente maiores de glicemia em comparação ao grupo WT, TLR-4 KO e MyD88 KO a partir do 10º dia após a primeira dose de STZ (Figura 3B). Além disso, uma maior perda de peso foi observada nos camundongos TLR-2 KO diabéticos quando comparados aos camundongos WT, TLR-4 KO e MyD88 KO diabéticos (Figura 3C).

Figura 3- Desenvolvimento de diabetes, glicemia e percentual de perda de peso em camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados com STZ.



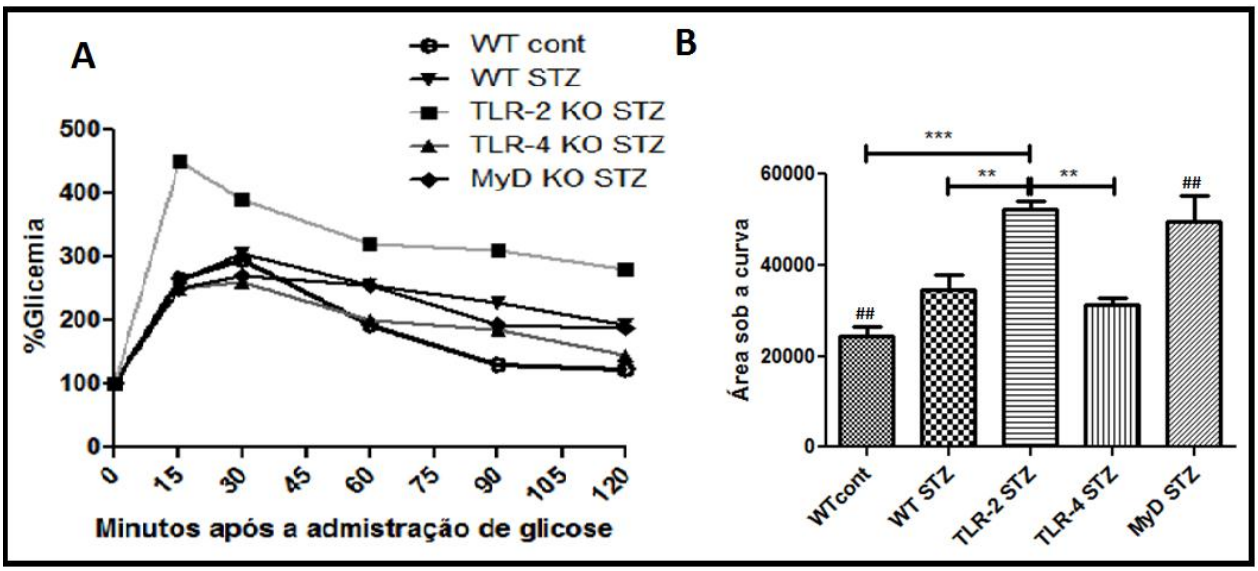
A) Perfil de desenvolvimento de diabetes em camundongos WT (preto), TLR-2 KO (vermelho), TLR-4 KO (verde) e MyD88 KO (azul) até 21 dias após a primeira dose de STZ. Porcentagem de animais hiperglicêmicos. Considerou-se diabéticos os animais que apresentaram glicemia com valor acima de 200 mg/dl por duas dosagens consecutivas. B) Acompanhamento dos níveis de glicemia após a primeira dose de STZ. Valores expressos como (média de porcentagem correspondente ao valor inicial ± desvio padrão). C) Variação de peso dos animais (em porcentagem) com o desenvolvimento de DMT1. Grupos experimentais: WT (n=17), TLR2 KO (n=12), TLR-4 KO (n=5) e MyD88 KO (n=15). Análise estatística: One-Way ANOVA, Bonferroni post test. * p<0,05.

5.2 Teste de tolerância à glicose

Tendo em vista o desenvolvimento de DMT1, avaliamos a seguir a resposta periférica à captação de glicose através do teste de tolerância à glicose 21 dias após a 1ª administração de STZ (Figura 4A). Foi administrado i.p. 1,5 mg de glicose por grama de camundongo, e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose (tempo 0) e nos tempos (minutos) 15, 30, 60, 90 e 120. Foi observada uma resistência significantemente

maior à glicose nos camundongos TLR-2 KO em comparação aos animais WT e TLR-4 KO, definido como a área sob a curva de tolerância à glicose (Figura 4B).

Figura 4- Teste de tolerância à glicose em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ.



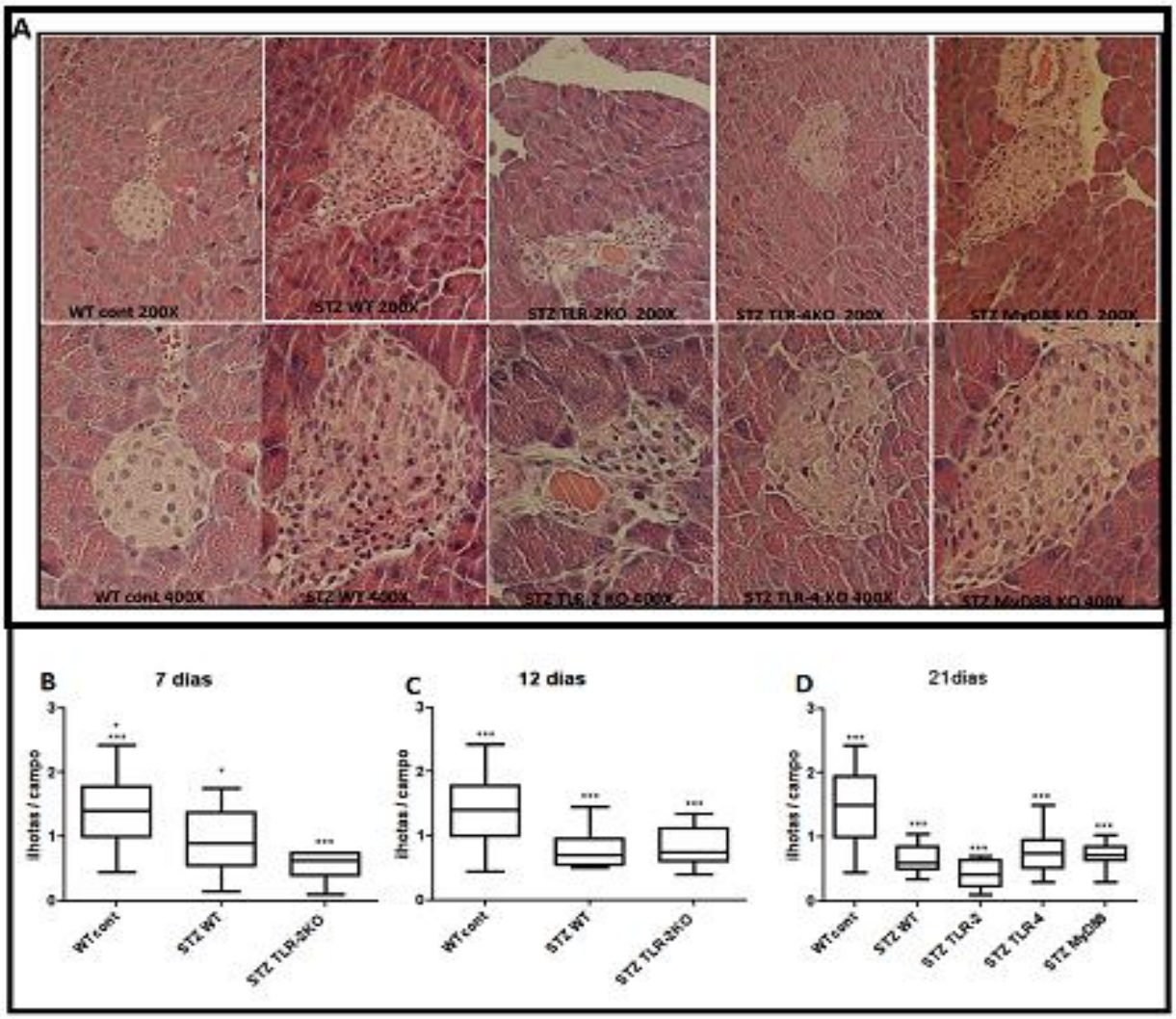
Análise da tolerância à glicose em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ. A) Curva de glicemia após a injeção de glicose intraperitoneal nos camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO 21 dias após o tratamento com STZ**.** Valores expressos como (média da porcentagem correspondente ao valor inicial ± desvio padrão). B) Índice de resistência à glicose, expresso como a área sob a curva correspondente ao tempo de 0 a 120 minutos após a administração de glicose. Valores expressos como (média da área sob a curva ± desvio padrão). Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. ** $p<0.01$. ## $p<0.01$. ***$p<0.0001$.

5.3 Análise histológica de tecido pancreático

Com o decorrer do desenvolvimento de DMT1 experimental, a destruição das ilhotas pancreáticas é associada à presença de infiltrado celular inflamatório (10, 76). Para análise histológica do pâncreas, dois parâmetros foram avaliados: o número de ilhotas por campo e o infiltrado celular inflamatório (Figura 5A). Números semelhantes de ilhotas foram verificados entre todos os grupos controles. Contudo, quanto aos camundongos diabéticos pôde-se observar a destruição de ilhotas pancreáticas, verificada pela diminuição no número de ilhotas por campo após o tratamento com STZ. Os grupos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO diabéticos apresentaram um número menor de ilhotas quando comparados ao grupo controle (WT controle, não diabético) nos dias 7, 12 e 21 (Figura 5B,C, e D respectivamente). No entanto, não foi observada

diferença significativa no número de ilhotas entre os grupos diabéticos, por corte histológico.

Figura 5- Determinação do número de ilhotas pancreáticas por campo em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ após 7, 12 e 21 dias.

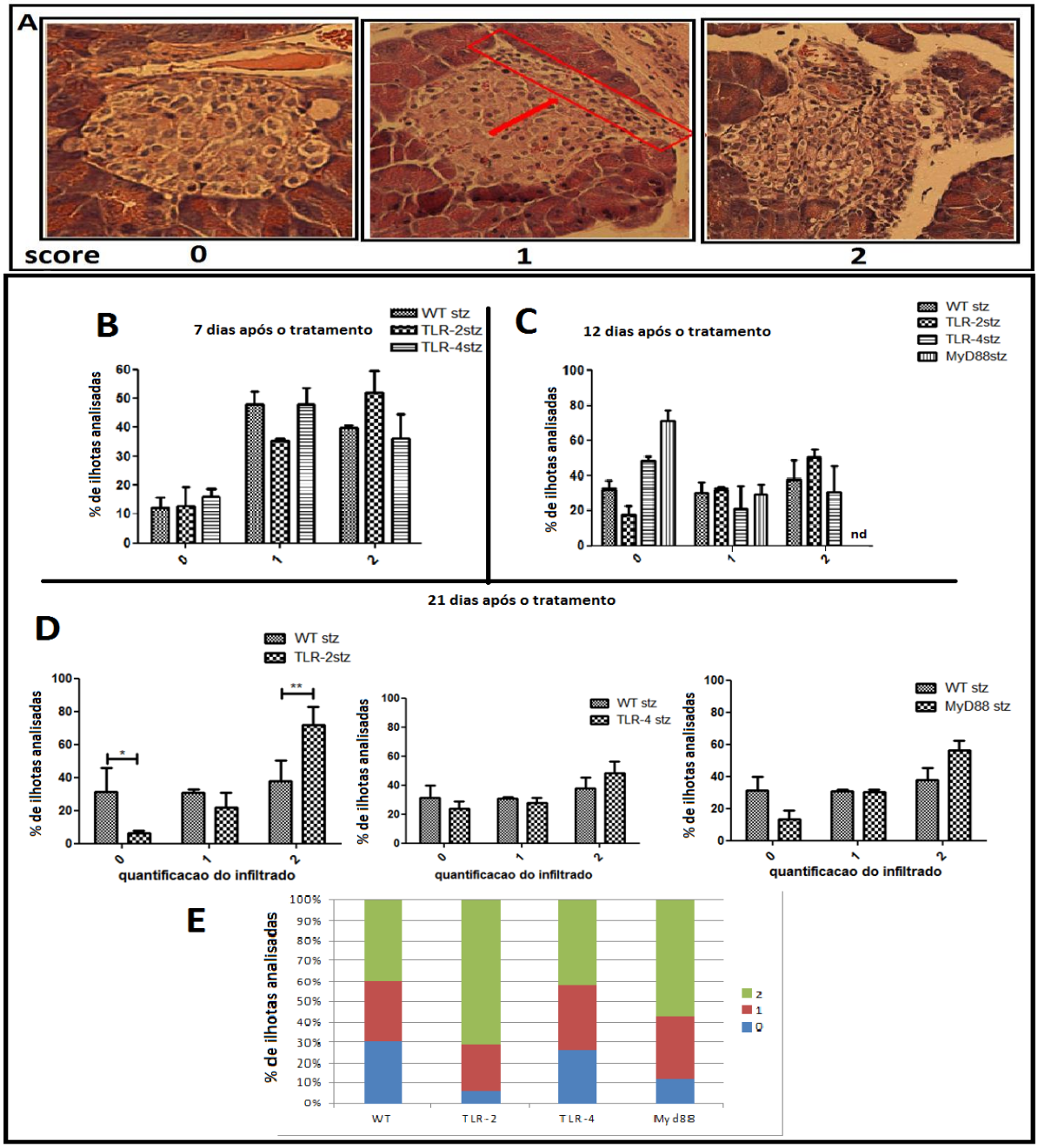


Análise histológica do pâncreas em cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). A) Imagens representativas de ilhotas pancreáticas 21 dias após a primeira dose de STZ. O número de ilhotas pancreáticas foi determinado pela contagem de 20 campos microscópicos para cada corte histológico (n=15) nos dias 7 (B), 12 (C) e 21 (D) após a primeira dose de STZ. Valores expressos como (média de ilhotas observadas por campo ± desvio padrão). Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. *WT controle vs. WT diabéticos, p<0,05. *** WT controle vs. grupos diabéticos, p<0.0001.

A seguir, analisou-se o processo de insulite nos dias 7, 12 e 21 conforme a presença de infiltrado celular e morfologia das ilhotas (Figura 6A). Não foram

observadas diferenças significativas quanto ao grau de insulite entre os animais TLR-2 KO diabéticos quando comparados aos grupos WT, TLR-4KO e MyD88 KO diabéticos nos dias 7 e 12 (Figura 6B e C). No entanto, 21 dias após a primeira dose de STZ, um maior grau de insulite pôde ser verificado nos animais TLR-2 KO diabéticos (Figuras 6D e E), sendo que o mesmo não foi observado para os camundongos TLR-4 KO e MyD88 KO diabéticos.

Figura 6- Quantificação de infiltrado celular e dismorfismo em ilhotas pancreáticas (insulite) de animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ após 7, 12 e 21 dias.

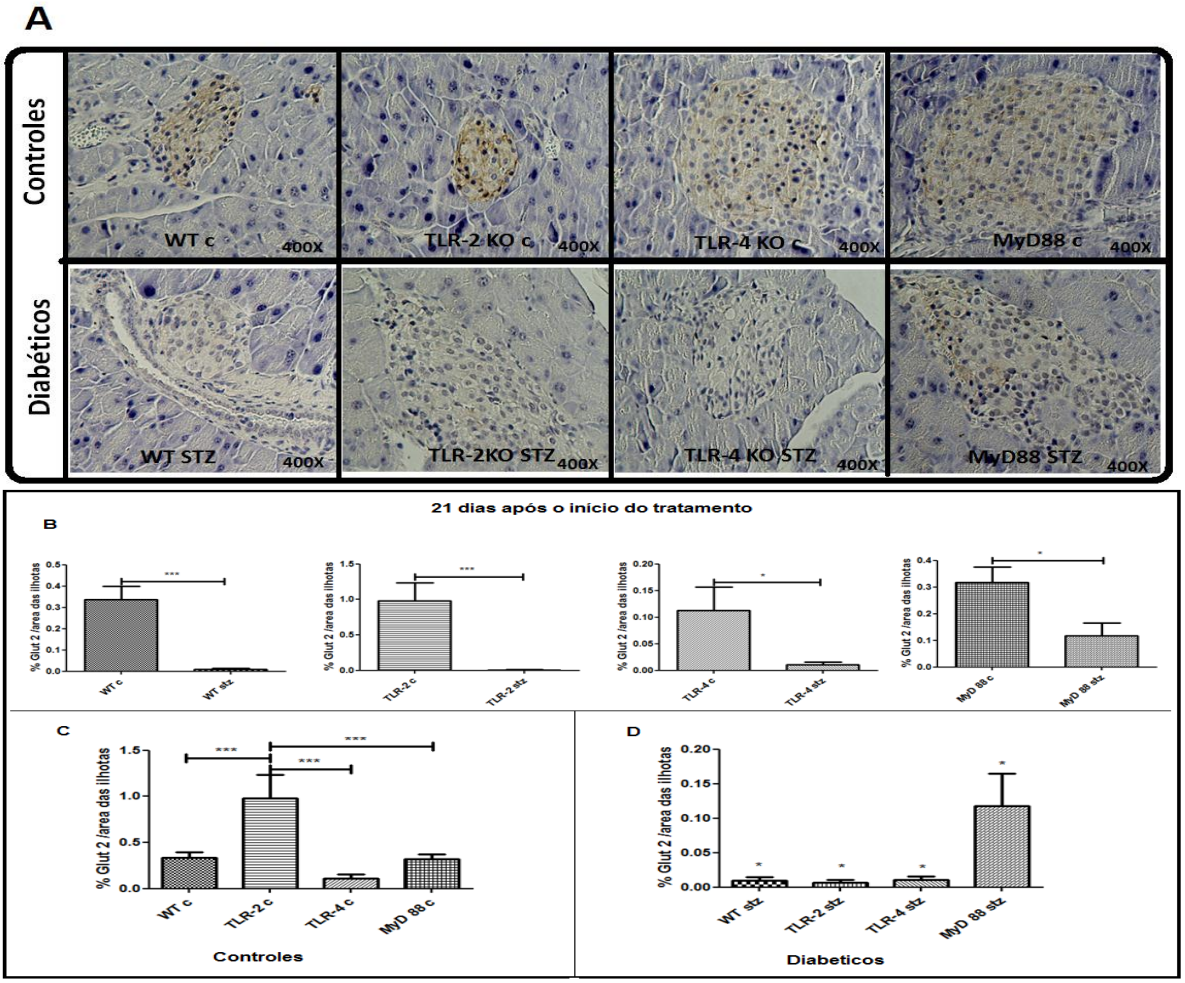


Análise semi-quantitativa de insulite em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ após 7, 12 e 21 dias. A) Imagem representativa do score de classificação de insulite: 0 = ausência de insulite; 1 = presença de discreto infiltrado celular ou peri-insulite; 2 = Presença de elevado infiltrado celular e ilhotas dismórficas. Análise comparativa não paramétrica do score de insulite nas ilhotas pancreáticas de animais diabéticos (STZ), após 7 (B), 12 (C) e 21 (D e E) dias após o tratamento com STZ. B) No grupo de 7 dias foram analisadas 126 ilhotas em 18 cortes histológicos. C) No grupo de 12 dias foram analisadas 411 ilhotas em 54 cortes histológicos. D) No grupo de 21 dias foram analisadas 571 ilhotas em 90 cortes histológicos. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. D e E) Análise representativa do score de insulite 21 dias após a primeira dose de STZ. Valores expressos como porcentagem média de ilhotas pancreáticas (%)±desvio padrão. *p<0,05. **p<0.01.

5.4 Expressão de Glut-2 nas ilhotas pancreáticas

Visando esclarecer o fundamento responsável pela patogênese exacerbada nos camundongos TLR-2 KO, estudamos a expressão do transportador 2 de glicose (Glut-2) nos camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO controle e diabéticos por imunohistoquímica 21 dias após a primeira dose de STZ. Uma menor expressão de Glut-2 foi observada nos camundongos diabéticos em relação aos seus controles (Figura 7A e B). De forma interessante, entre os camundongos controles (não diabéticos) foi observada expressão significativamente maior deste receptor nos animais TLR-2 KO (Figura 7C). Já entre os animais diabéticos, uma maior expressão de Glut-2 foi observada para os MyD88 KO (Figura 7D).

Figura 7- Expressão de Glut-2 em ilhotas pancreáticas de animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ após 21 dias.



Análise da expressão de Glut-2 por imunohistoquímica em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ após 21 dias. A) Figura representativa de imunohistoquímica para Glut-2 em ilhotas pancreáticas de camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO controles (não diabéticos) e diabéticos. B) Quantificação da expressão de Glut-2 entre camundongos diabéticos e seus respectivos controles. C) Quantificação da expressão de Glut-2 entre camundongos controles. D) Quantificação da expressão de Glut-2 entre camundongos diabéticos. Utilizou-se o software NIS *Elements* (Nikon) para a análise de marcação positiva nas ilhotas. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. *p<0,05. ***p<0,0001.

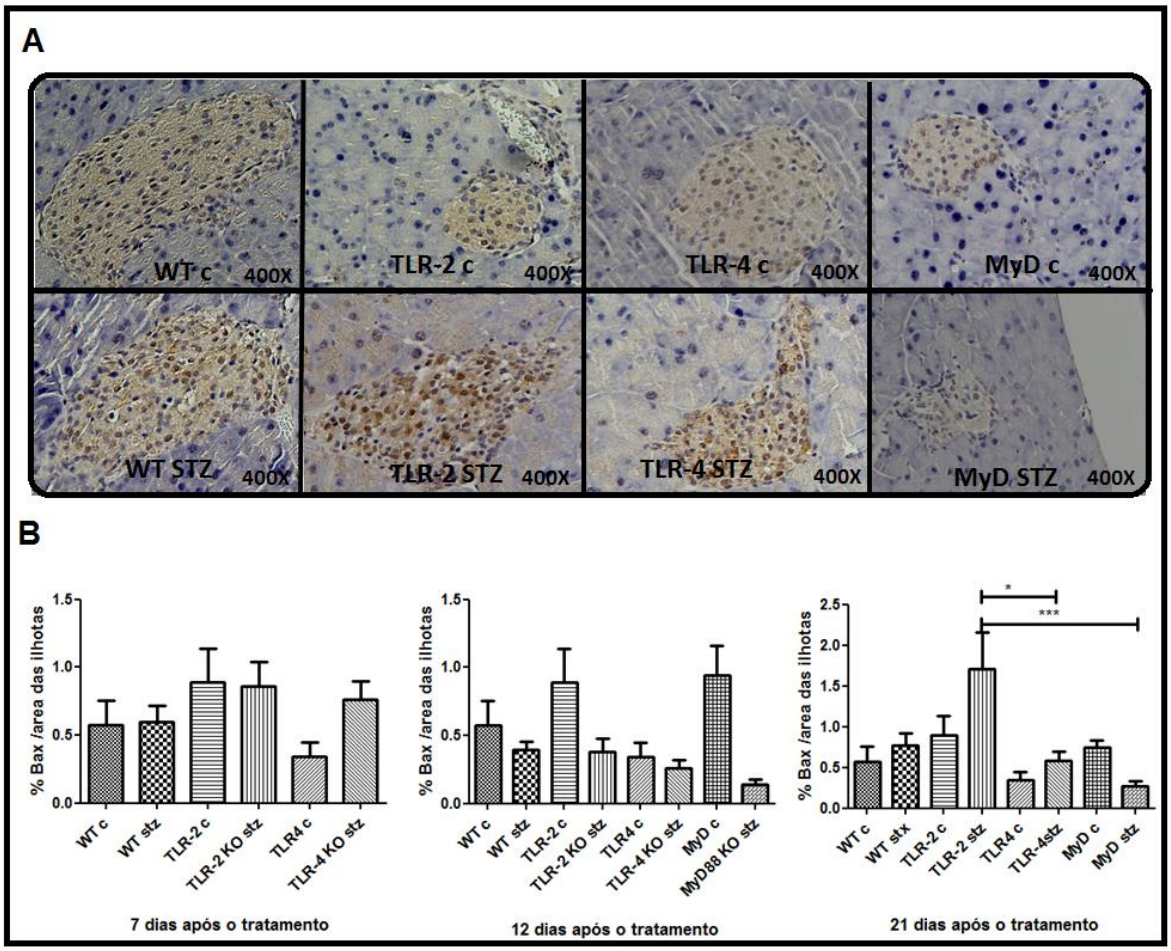
5.5 Expressão de Bcl-2, Bax e caspase 3 em ilhotas pancreáticas

Diversos trabalhos recentes têm discutido os mecanismos que levam à morte de células β pancreáticas no desenvolvimento de DMT 1, contudo, mais estudos são

necessários para elucidar estes mecanismos. Desta forma, com o objetivo de estudar o perfil de morte celular na patogênese da doença, realizou-se imunohistoquímica para Bcl-2 e Bax, proteínas anti- e pró-apoptóticas, respectivamente, e caspase-3 ativada, também pró-apoptótica, em cortes histológicos de camundongos diabéticos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO nos dias 7, 12 e 21 após o início do tratamento com STZ (Figuras 8, 9, 10 e 11).

De acordo com os resultados obtidos, a expressão de Bax tende a aumentar aos 21 dias nos camundongos diabéticos quando comparados aos seus controles (Figura 8A e B). Entre os camundongos diabéticos, foi observada uma maior expressão de Bax no grupo TLR-2KO quando comparado ao grupo TLR-4 KO e MyD88 KO (Figura 8B).

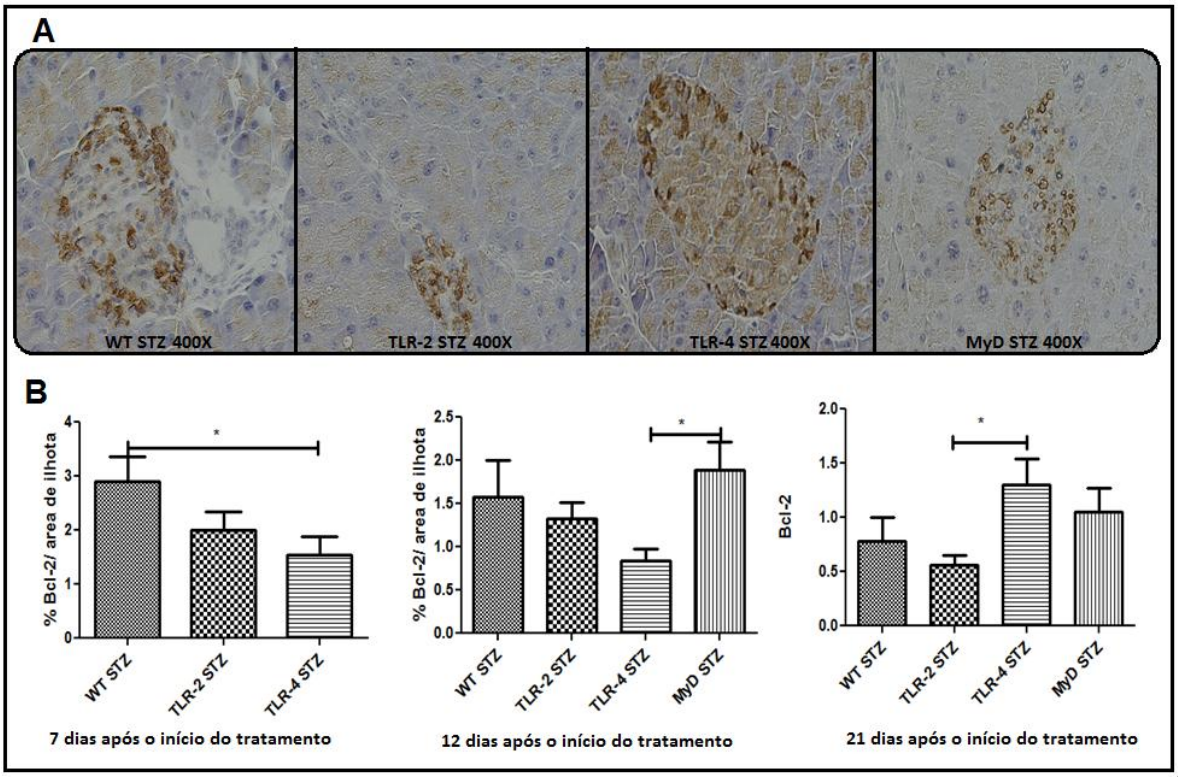
Figura 8- Expressão de Bax em ilhotas pancreáticas de animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ após 7, 12 e 21 dias.



Análise da expressão de Bax por imunohistoquímica em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ após 7, 12 e 21 dias. A) Figura representativa de imunohistoquímica para Bax em ilhotas pancreáticas de camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO controles (c) e diabéticos (stz) 21 dias após o primeiro tratamento com STZ. B) Quantificação da expressão de Bax nos dias 7 (à esquerda), 12 (centro) e 21 (à direita) utilizando o software NIS *Elements* (Nikon). Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. * $p<0,05$. ***$p<0,0001$.

Em contrapartida, considerando os animais diabéticos, observou-se que houve uma redução estatística na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 nos animais TLR-4 KO em comparação ao grupo WT (Figura 9B) no dia 7 após o inicio do tratamento. Aos 12 dias, foi observada menor expressão de Bcl-2 nos TLR-4 KO quando comparado aos outros grupos, sendo significativamente menor em relação aos camundongos MyD88 KO. Já aos 21 dias, observou-se uma menor expressão de Bcl-2 no grupo TLR-2KO comparado ao grupo TLR-4 KO (Figura 9 A e B).

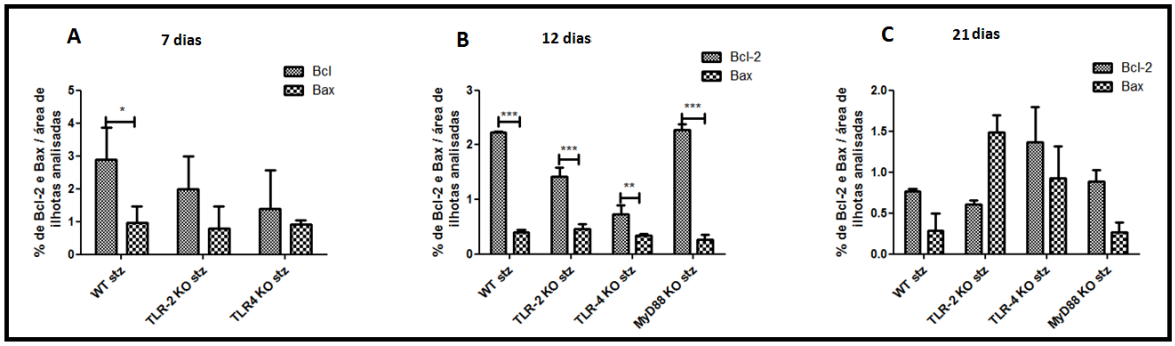
Figura 9- Expressão de Bcl-2 em ilhotas pancreáticas de animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados com STZ após 7, 12 e 21 dias.



Análise da expressão de Bcl-2 por imunohistoquímica em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados com STZ após 7, 12 e 21 dias. A) Figura representativa de imunohistoquímica para Bcl-2 em ilhotas pancreáticas de camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO e diabéticos (stz) 21 dias após o primeiro tratamento com STZ. B) Quantificação da expressão de Bcl-2 nos dias 7 (à esquerda), 12 (centro) e 21 (à direita) utilizando o software NIS *Elements* (Nikon). Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. * $p<0,05$.

Uma análise da relação Bcl-2/Bax foi realizada para comparar os dados obtidos nos camundongos WT, TLR-2, TLR-4 e MyD88 KO (Figura 10). De acordo com estas, foi possível observar uma maior expressão de Bcl-2 ao longo do desenvolvimento da doença nas ilhotas dos camundongos WT, TLR-4 e MyD88 KO (Figura 10 A e B). Nos dias 7 e 12, foi observada também uma maior expressão de Bcl-2 nos camundongos TLR-2 KO, sendo significativa no 12º dia (Figura 10 A e B). Já aos 21 dias, diferente dos outros grupos, a expressão de Bcl-2 nos TLR-2 KO tendeu a diminuir, enquanto a expressão de Bax aumentou (Figura 10C).

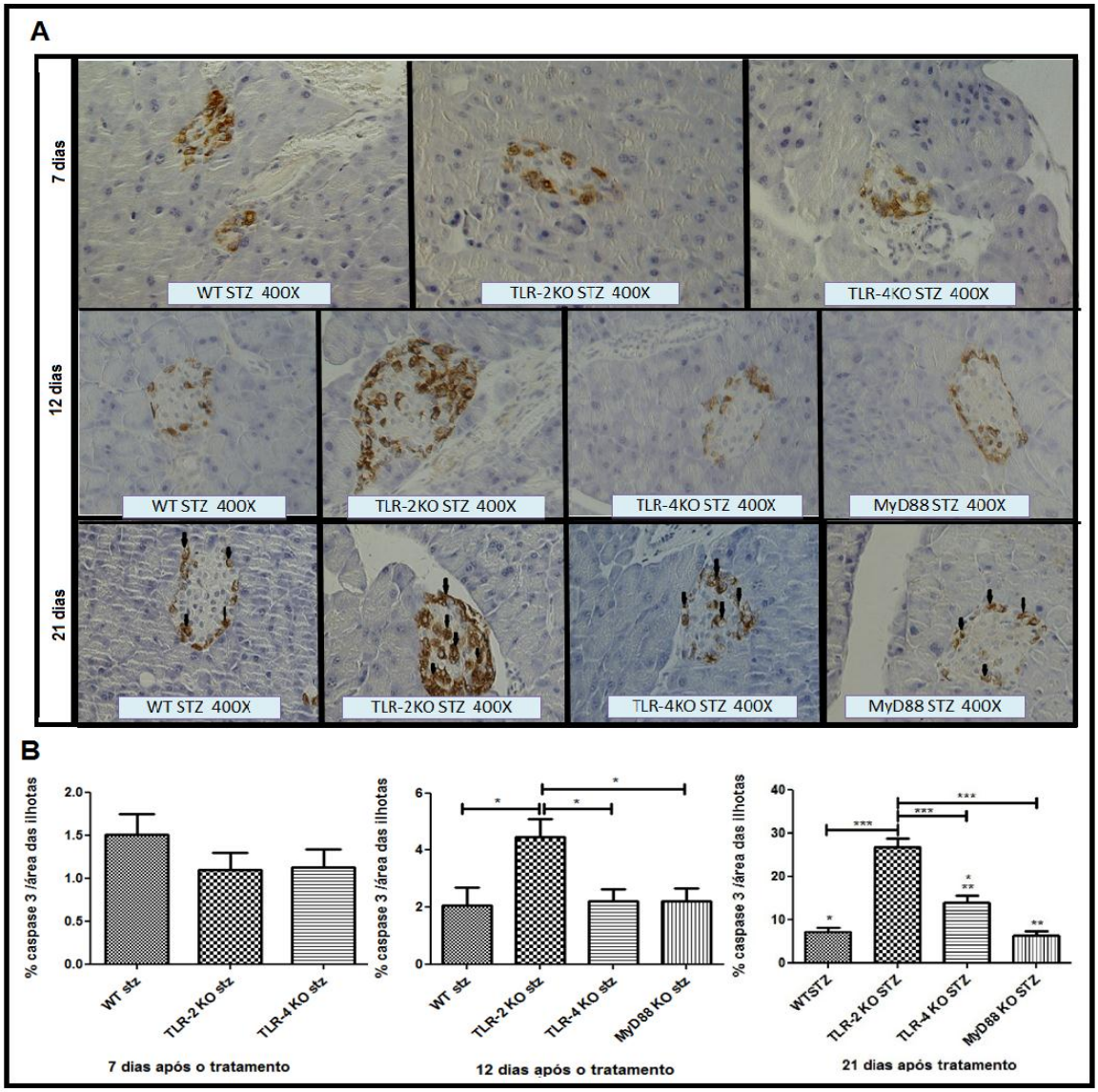
Figura 10- Relação de expressão de Bcl-2 e Bax em ilhotas pancreáticas des animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados com STZ após 7, 12 e 21 dias.



Anális e comparativa da expressão de Bcl-2 e Bax nos dias 7 (A), 12 (B) e 21 (C) após o início do tratamento, utilizando o software NIS Elements (Nikon) Valores expressos como porcentagem média de área de expressão de Bcl-2 ou Bax em ilhotas pancreáticas (%) ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. * p<0,05. ** p<0.01. *** p<0,0001.

A marcação para caspase 3 ativada foi utilizada como um marcador do processo de apoptose (Figura 11A). Nos dias 12 e 21, foram observadas maiores expressões de caspase 3 ativada nos TLR-2 KO diabéticos em relação aos grupos WT, TLR-4 KO e MyD88 KO diabéticos. Ainda, aos 21 dias, foi observada uma expressão significativamente maior dessa enzima entre o TLR-4 KO e os animais WT e MyD88 KO (Figura 11B).

Figura 11- Expressão de caspase-3 em ilhotas pancreáticas des animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados ou não com STZ após 7, 12 e 21 dias.

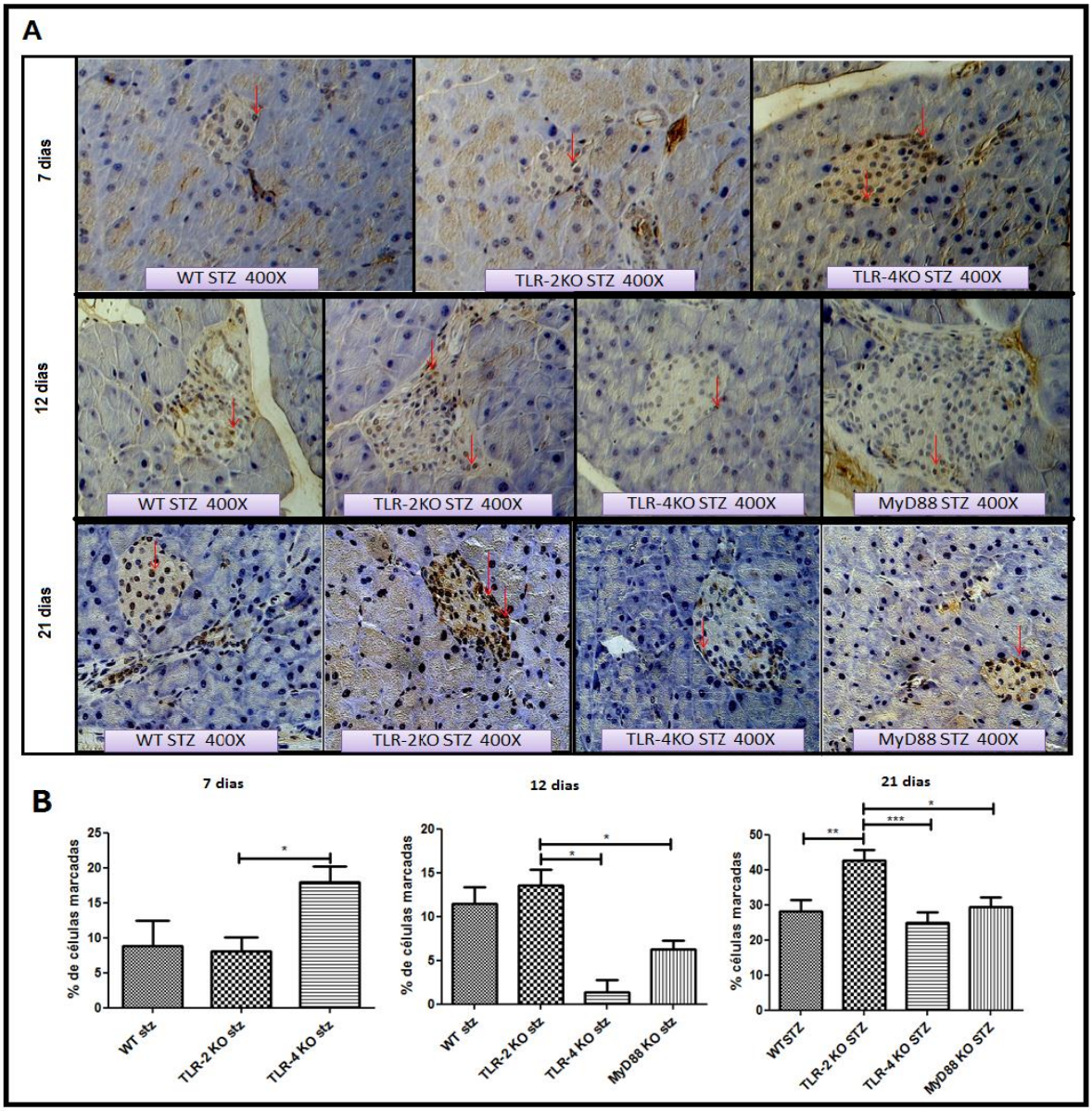


Análise da expressão de caspase-3 ativada por imunohistoquímica em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados com STZ após 7, 12 e 21 dias. A) Figura representativa de imunohistoquímica para caspase-3 ativada em ilhotas pancreáticas de camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO diabéticos (stz) 21 dias após o primeiro tratamento com STZ. B) Quantificação da expressão de caspase-3 utilizando o software NIS Elements (Nikon). Valores expressos como porcentagem média de área com expressão de caspase-3 ativada em ilhotas pancreáticas (%) ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. *p<0,05. **p<0.01. ***p<0,0001.

5.6 Avaliação da presença de células imunes inatas em ilhotas pancreáticas

Já se tem demonstrado a participação de células da imunidade inata, por exemplo, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, durante o desenvolvimento de DMT1 (72, 77, 78, 79). Assim, com o objetivo de analisar a participação destas células na resposta imune que ocorre nas ilhotas pancreáticas, avaliou-se as mesmas para a marcação positiva de CD11b e mieloperoxidase por imunohistoquímica, conforme mostrado na figura 12. Foi observado uma maior porcentagem das células CD11b+ nas ilhotas pancreáticas de camundongos TLR-4 KO diabéticos quando comparados ao grupo TLR-2 KO, havendo uma tendência para o grupo WT no 7º dia após o início do tratamento (Figura 12A e B). Ainda foi visto nos TLR-2KO uma maior porcentagem significativamente maior de células CD11b+ no 12º dia quando comparado aos TLR-4 KO e MyD88 KO. O mesmo foi observado aos 21 dias após a administração de STZ nos TLR-2 KO em relação aos outros grupos diabéticos (WT, TLR-4 KO e MyD 88 KO)(Figura 12A e B).

Figura 12- Análise de células CD11b+ em ilhotas pancreáticas de animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados com STZ após 7, 12 e 21 dias.

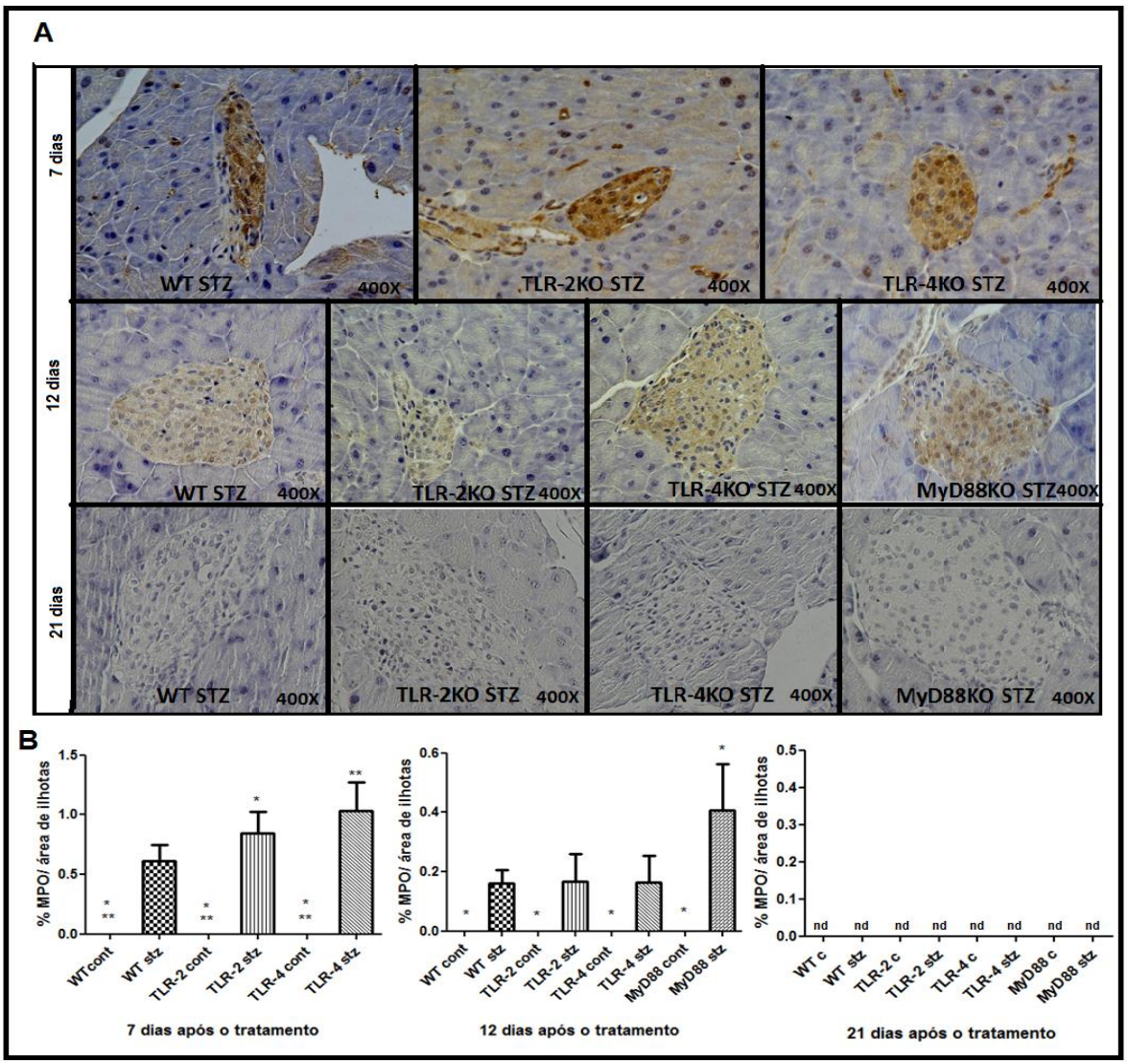


Análise da expressão de CD11b por imunohistoquímica em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados com STZ após 7, 12 e 21 dias. A) Figura representativa de imunohistoquímica para CD11b em ilhotas pancreáticas de camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO diabéticos (stz) 7, 12 e 21 dias após o primeiro tratamento com STZ. Setas indicam células positivamente marcadas. B) Quantificação de células CD11b+ nos dias 7 (à esquerda), 12 (centro) e 21 (à direita) utilizando o software NIS Elements (Nikon). Valores expressos como porcentagem média de células positivas para CD11b em ilhotas pancreáticas (%) ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA, Bonferroni post test. *p<0,05. **p<0.01. ***p<0,0001.

A seguir estabeleceu-se a marcação para mieloperoxidase como indicador indireto da presença de neutrófilos. Foi observada presença de destas células em ilhotas

principalmente no 7º dia após a primeira dose de STZ, onde valores estatisticamente maiores de expressão foram observados nos grupos diabéticos TLR-2 KO e TLR-4 KO quando comparados aos diferentes grupos controles. Nos 12º dia, a expressão da mieloperoxidase foi estatisticamente maior nos MyD88 KO diabéticos quando comparados aos grupos controles. E, aos 21 dias, não foram observadas marcações para mieloperoxidase (Figura 13B).

Figura 13- Análise da expressão de mieloperoxidase em ilhotas pancreáticas dos animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO 7, 12 e 21 dias após indução do DMT1**.**



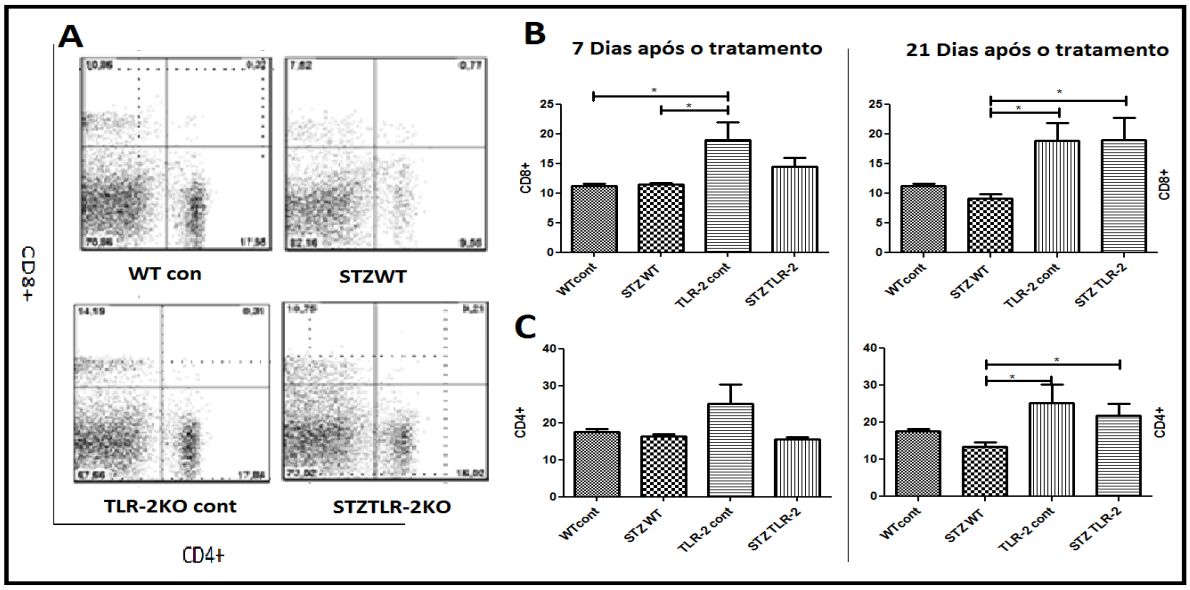
Análise da expressão de mieloperoxidase (MPO) por imunohistoquímica em animais WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO tratados com STZ após 7, 12 e 21 dias. A) Figura representativa de imunohistoquímica para MPO em ilhotas pancreáticas de camundongos WT, TLR-2 KO, TLR-4 KO e MyD88 KO diabéticos (stz) 7, 12 e 21 dias após o primeiro tratamento com STZ. B) Quantificação da expressão de mieloperoxidade nos dias 7 (à esquerda), 12 (centro) e 21 (à direita) utilizando o software NIS Elements (Nikon). Valores expressos como porcentagem média de células positivas para MPO em ilhotas pancreáticas (%) ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Dunnett post test. * $p<0,05$. ** $p<0.01$

5.7 Frequência de células imunes envolvidas no desenvolvimento de DMT1

Visando melhor esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do DMT1 mais severo observado nos TLR-2 KO em comparação ao grupo WT, foram avaliadas as frequências de células T CD8+, T CD4+, T CD4+CD25+Foxp3+, células dendríticas (CD11c+) e macrófagos (F4/80+) no baço dos animais, por citometria de fluxo.

Obteve-se, portanto por *dotplots*, as freqüências dos linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+ observadas no baço dos animais diabéticos (STZ) e não diabéticos (controle) (WT e TLR-2 KO) (Figura 14A). Foi observada nos camundongos diabéticos TLR-2 KO, uma maior frequência de células T CD8+ e células T CD4+ aos 21 dias após o início do tratamento, em comparação com os camundongos diabéticos WT (Figuras 14B e 14C, respectivamente).

Figura 14- Frequência de células T CD4+ e CD8+ no baço de camundongos WT e TLR-2 KO 7 e 21 dias após o inicio de tratamento com STZ e em animais controles.

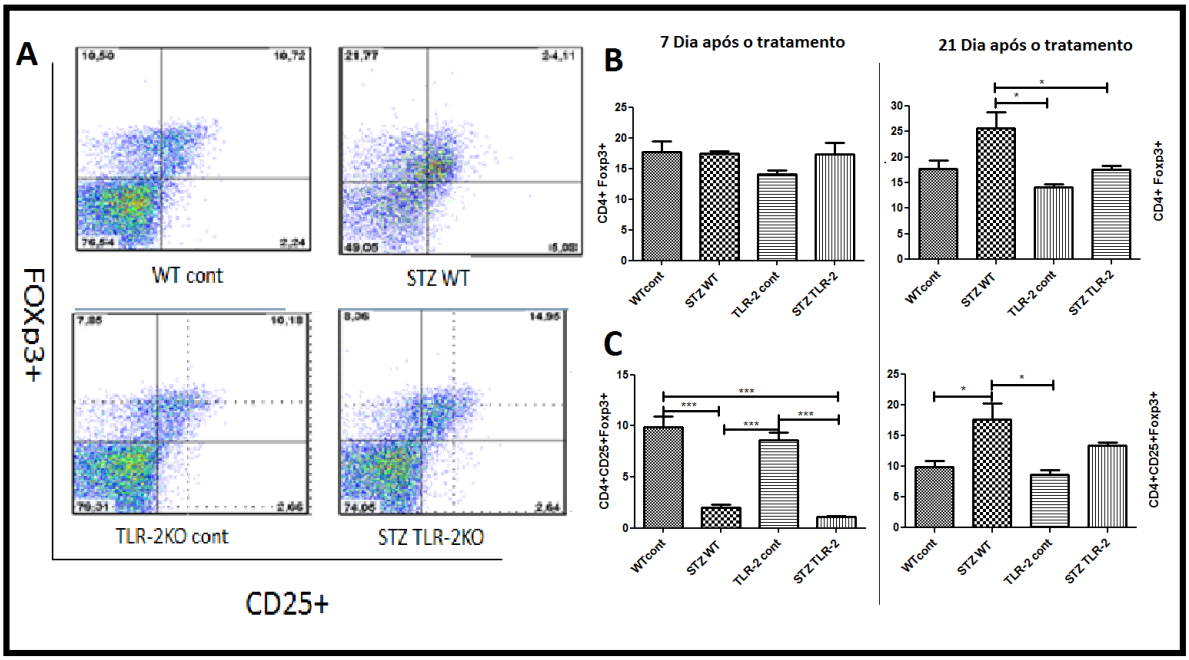


Frequência de células T CD4+ e CD8+ no baço de camundongos WT e TLR-2 KO controle e 7 e 21 dias após o inicio de tratamento com STZ. Foram utilizados camundongos diabéticos (WT STZ, n=6; TLR-2 KO STZ, n=5) e camundongos não diabéticos (n=3). A) Dot-plot representativo da frequência de células T CD8+ e células T CD4+. B) Gráfico de frequência de células T CD8+ 7 dias (à esquerda) e 21 dias (à direita) após o tratamento com STZ. C) Gráfico de frequência de células T CD4+ no baço 7 (à esquerda) e 21 dias (à direita) após o tratamento com STZ. Valores expressos como porcentagem média células positivas ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. *p<0,05. **p<0,01.

Uma análise detalhada das células T CD4+ foi realizada com objetivo de avaliar a frequência de células T CD4+Foxp3+ e células T CD4+CD25+Foxp3+ (T reguladoras)

(Figura 15), visto que essas células têm um papel importante na modulação da resposta imune durante o desenvolvimento do DMT1 experimental (80, 81). Foi observada, 7 dias após o tratamento, uma menor frequência de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) nos camundongos diabéticos WT e TLR-2 KO em comparação aos respectivos controles (Figura 15C). Em contrapartida, uma maior frequência destas células T reguladoras nos camundongos WT diabéticos em relação ao grupo controle foi vista após 21 dias de tratamento (Figura 15C). Interessantemente, uma menor frequência de células T CD4+Foxp3+ foi observada no baço dos camundongos TLR-2 KO diabéticos em comparação aos camundongos WT diabéticos após 21 dias de tratamento (Figura 15 B).

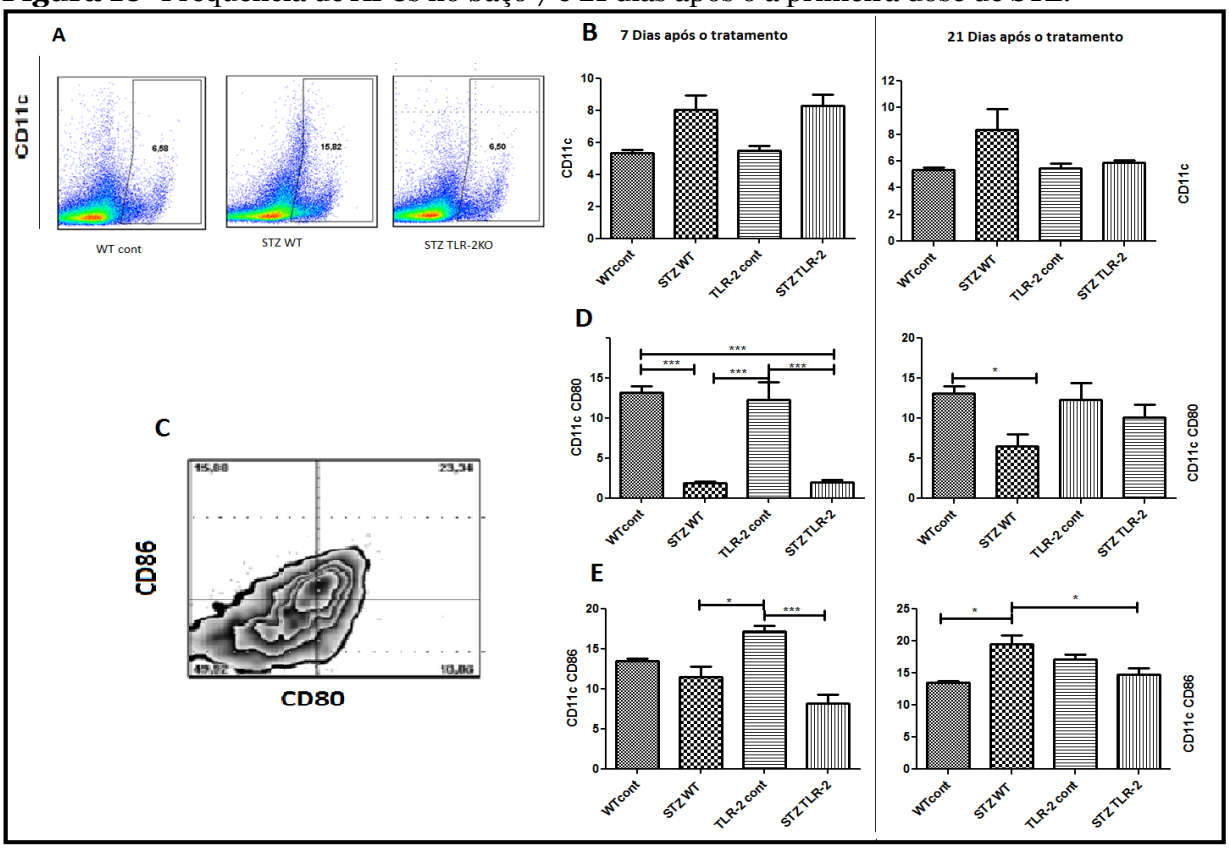
Figura 15- Frequência de células T reguladoras no baço dos animais WT e TLR2 KO 7 e 21 dias após o DMT1 experimental e nos respectivos controles.



Frequência de células T reguladoras (CD4+ Foxp3+ e CD4+CD25+Foxp3+) no baço de animais WT e TLR2 KO controle ou 7 e 21 dias após o DMT1 experimental. A) *Dot plot* representativo da frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ no baço de animais WT ou TLR-2 KO controle ou diabéticos (STZ) 21 dias após tratamento. B) Gráfico da frequência de células T CD4+Foxp3+ no baço dos animais 7 dias (à esquerda) e 21 dias (à direita) após o tratamento com STZ. C) Gráfico representativo da frequência de células CD4+CD25+Foxp3+ no baço dos animais 7 (à esquerda) e 21 dias (à direita) após o tratamento com STZ. Foram utilizados camundongos diabéticos (STZ WT, n=6; STZ TLR-2 KO, n=5) e camundongos não diabéticos (controle, n=3). Valores expressos como porcentagem média células positivas ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. *p<0,05. ***p<0,0001.

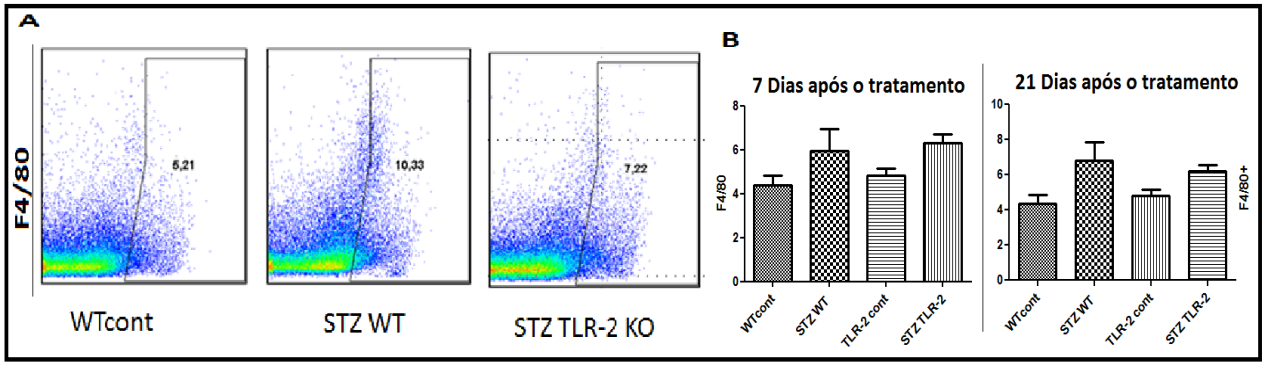
Diversos estudos têm demonstrado o papel das APCs na modulação da resposta imune em camundongos diabéticos através da produção de citocinas como IL-10 ou TGF-β (77, 82, 78, 62). No presente estudo, ao analisar a frequência de células CD11c+CD80+, observou-se que houve uma redução significante destas células no baço de animais WT e TLR-2 KO em comparação ao seus respectivos controles 7 dias após a administração de STZ (Figura 16D). Este perfil de frequência também se mostrou presente no dia 21 para o grupo WT (Figura 16D). Quanto à frequência de células CD11c+CD86+, observou-se uma redução desta população celular no baço de animais TLR-2 KO diabéticos em comparação com seu controle no dia 7 após o tratamento com STZ (Figura 16E). Já no dia 21, houve um aumento desta população nos animais WT diabéticos em comparação com seu controle, sendo significante também a redução desta população em animais TLR-2 diabéticos em relação ao grupo WT diabético (Figura 16E). Em relação aos macrófagos, não foi observado diferença na frequência das células F4/80+ no baço dos camundongos diabéticos quando comparados ao grupo controle (Figura 17).

Figura 16- Frequência de APCs no baço 7 e 21 dias após o a primeira dose de STZ.



Frequência de APCs no baço de animais WT e TLR-2 KO controles ou 7 e 21 dias após a primeira dose de STZ. A) *Dot plot* representativo da frequência de células CD11c+. B) Gráfico de frequência de células CD11c+ após 7 dias (à esquerda) e 21 dias (à direita) do tratamento com STZ. C) *Dot plot* representativo da frequência de células CD80+CD86+ no *gate* de células CD11c+. D) Gráficos de frequência de células CD11c+CD80 e (E) Gráficos de frequência de células CD11c+CD86+, após 7 dias (à esquerda) e 21 dias (à direita) do tratamento com STZ. Valores expressos como porcentagem média células positivas ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test.* p<0,05. **p<0.01. *** p<0,0001.

Figura 17- Frequência de macrófagos (células F4/80+) no baço, 7 e 21 dias após o desenvolvimento de DMT1 experimental.

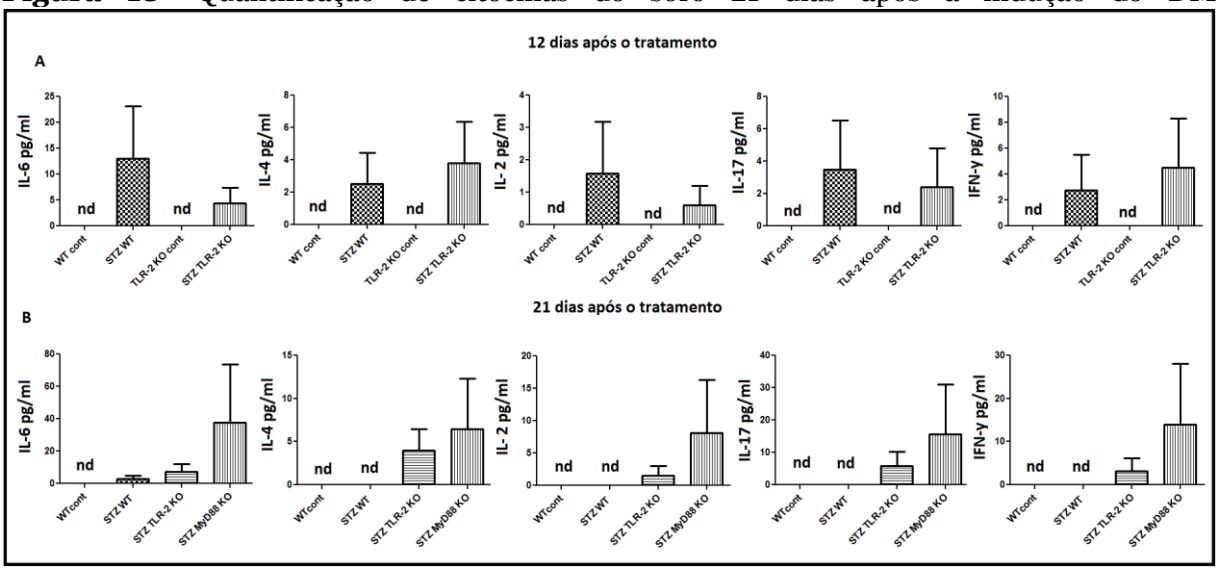


Análise da população de macrófagos (células F4/80+) no baço de animais WT e TLR-2 KO controle ou diabéticos, 7 e 21 dias após o desenvolvimento de DMT1 experimental. A) *Dot plot* representativo da frequência de células F4/80+no baço. B) Gráfico da frequência de células F4/80+ após 7 dias (à esquerda) e 21 dias (à direita). Foram utilizados camundongos WT controle (n=3); WT STZ (n=6) e TLR-2 KO STZ (n=5). Valores expressos como porcentagem média células positivas ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test.

5.8 Dosagem de citocinas

No soro dos camundongos sacrificados com 12 e 21 dias, foram quantificadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 e IFN-γ (Figura 18). No grupo controle (WT), estas citocinas não foram detectadas (Figuras 18 A e B). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de 12 dias após indução do DMT1 (Figura 18A). No entanto, níveis elevados de IL-2, IL-4, IL-17 e IFN-γ foram detectados no soro dos animais TLR-2 KO e MyD88 KO diabéticos 21 dias após o primeiro tratamento com STZ, quando comparados ao grupo WT.

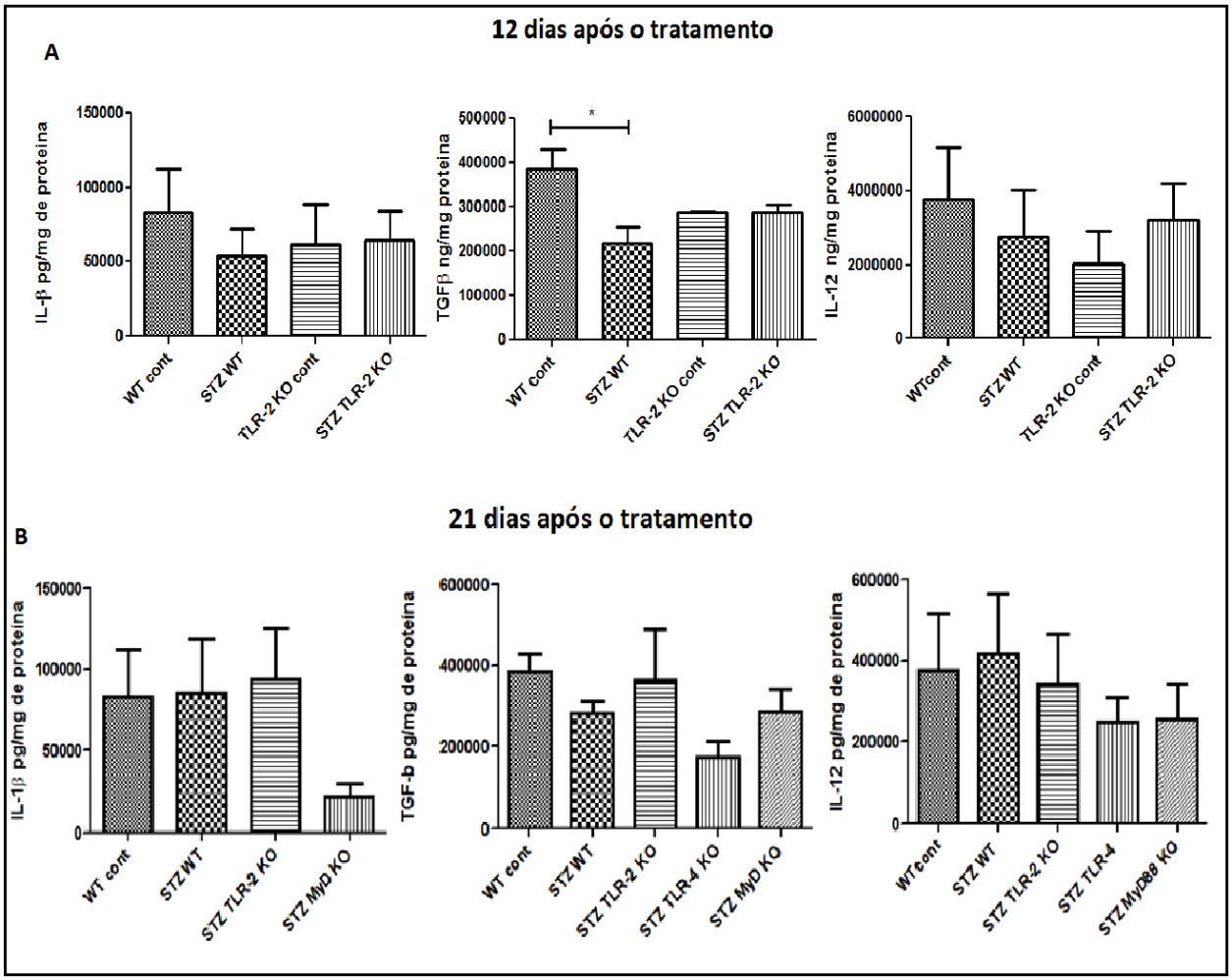
Figura 18- Quantificação de citocinas do soro 21 dias após a indução do DMT1.



Análise de citocinas no soro pela técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*). A) Quantificação de citocinas (IL-6, IL-4, IL-2, IL-17 e IFN-γ) em animais WT, TLR-2 KO e MyD88 KO controle e diabéticos 12(A) dias e 21(B) dias após a administração de STZ. Foram utilizados camundongos com n=3-5/grupo experimental. Valores expressos como média (pg/mL) ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. nd= não detectado.

Para avaliação da resposta inflamatória local, as citocinas IL-1β, IL-12p70 e TGF-β foram quantificadas a partir do tecido pancreático. Não foram observadas diferenças significativas na produção das citocinas IL-1β e IL-12 nos camundongos diabéticos quando comparados aos grupos controles (WT e TLR-2 KO), 12 dias após a indução do DMT1 (Figura 19A). No entanto, uma maior concentração de TGF-β ativo foi detectada no grupo WT controle em comparação ao grupo de animais WT diabéticos, sendo que o mesmo não foi observado para os animais TLR-2 KO (diabéticos vs. não diabéticos). Também não houve diferença estatística na expressão destas citocinas 21 dias após o tratamento com STZ (Figura 19B).

Figura 19- Quantificação de citocinas pancreáticas.



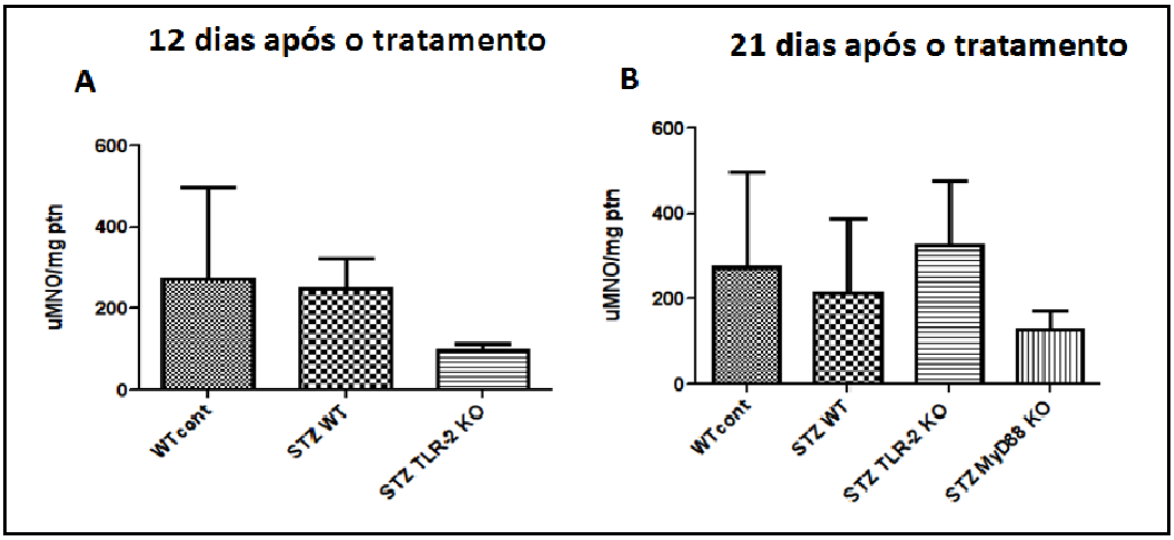
Quantificação de citocinas pancreáticas aos 12 (A) e 21(B) dias após tratamento com STZ. n=3-6/grupo experimental. Valores expressos como média (pg/mL) ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test. *p<0,05.

5.9 Quantificação indireta de óxido nítrico

Pesquisas recentes têm apontado que a citocina IL-1β é capaz de induzir a expressão da enzima iNOS (do inglês, *Inducible nitric oxide synthase)* , ativando a síntese do NO e de radicais livres de oxigênio, causando assim a morte de células β pancreáticas (45). Baseado nestes estudos, realizamos a quantificação de NO a partir do lisado pancreático. Não foram observadas diferenças na produção de NO entre os camundongos diabéticos e não diabéticos aos 12 e 21 dias após o tratamento com STZ (Figuras 120A e B, respectivamente) por este método. Desta forma, para melhorar a

detecção e remover os possíveis interferentes presentes no tecido exógeno do pâncreas, isolamos as ilhotas pancreáticas para posterior quantificação de NO (item 5.12).

Figura 20. Quantificação de oxido nítrico.

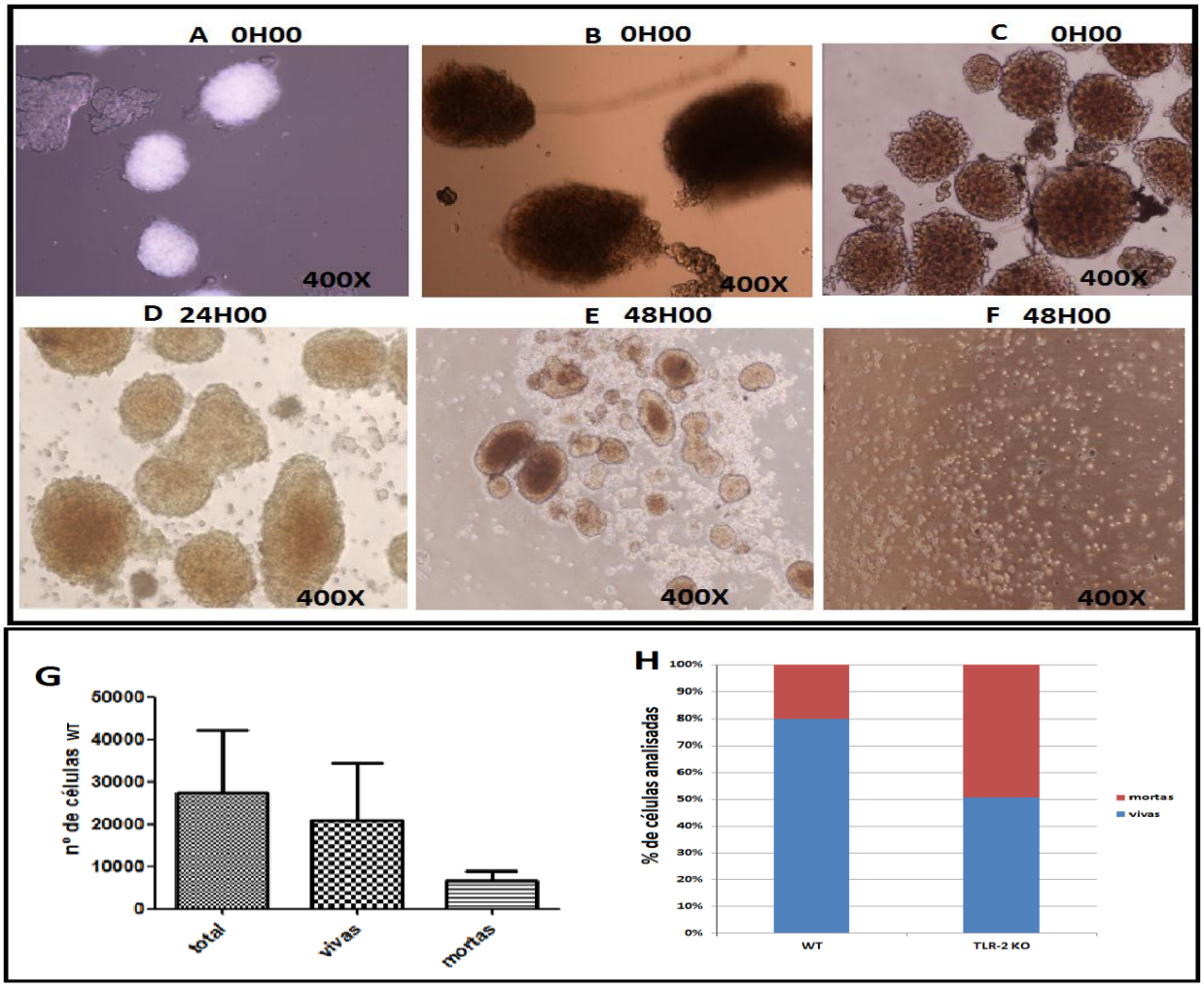


Quantificação de oxido nítrico pela técnica de Griess no lisado pancreático aos 12 (A) e 21 (B) dias após o primeiro tratamento com STZ. n = 3 animais/grupo experimental. Valores expressos como média de NO (uM) /mg de proteína) ± desvio padrão. Análise estatística: One-Way ANOVA e Bonferroni post test.

5.10 Isolamento de ilhotas pancreáticas

Com o objetivo de estudar as moléculas expressas e secretadas durante desenvolvimento do DMT1, padronizamos o isolamento de ilhotas pancreáticas em camundongos C57BL/6. Nas figuras 20 A, B e C estão representadas as ilhotas isoladas que tiveram suas membranas conservadas, sendo separadas dos vasos sanguíneos e do tecido exócrino. As células das ilhotas foram dispersas (Figura 21F). A viabilidade celular foi avaliada pela coloração de azul de Tripan após 3 (Figura 21G) e 14 dias (Figura 21H) em cultura. Analisando a viabilidade das células das ilhotas, foi observado 38 células mortas e 39 células vivas nos TLR-2 KO quando comparado ao grupo WT (20 células mortas e 80 células vivas)(Figura 21H).

Figura 21- Isolamento de ilhotas pancreáticas nos camundongos C57Bl/6.



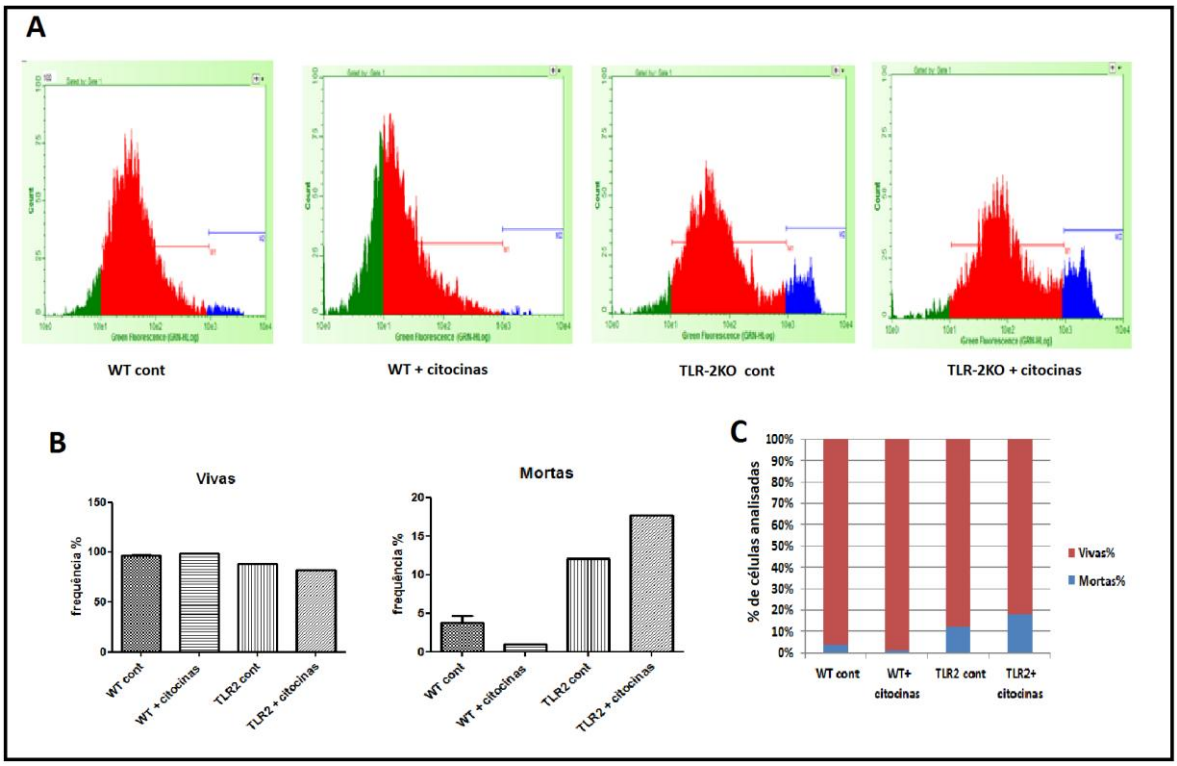
A - C)Imagens representativas de ilhotas depois do isolamento. D) Imagem representativa de ilhotas após 24 horas. E) Imagem representativa de ilhotas após 48 horas de cultura. F) Imagem representativa de células dispersas após 48 horas de cultura. G) Quantificação de viabilidade celular pela coloração de azul de Tripan, após 3 e H) 14 dias de cultura, respectivamente. As células vivas estão marcadas com a cor azul e as mortas estão marcadas em vermelho. Valores expressos como média de células ± desvio padrão.

5.11 Ensaio de morte de células das ilhotas pancreáticas

Com o objetivo de analisar nos camundongos TLR-2 KO a sensibilidade de ilhotas pancreáticas à morte induzida pelas citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e IFN-y), padronizou-se o ensaio de morte induzida por citocinas, analisando a morte/viabilidade

celular por anexina V e 7AAD (Figura 22). As células mortas marcadas com anexina V estão representadas em azul no histograma (Figura 22A). Resultados obtidos sugerem que as células advindas de ilhotas pancreáticas de camundongos TLR-2 KO possuem maior sensibilidade para morte em comparação com as isoladas de animais WT (Figura 22B e C). Em acréscimo, esta sensibilidade se agrava quando as ilhotas são estimuladas com IL-1β + IFN-y.

Figura 22- Ensaio de morte induzida por IL-1β + IFN-y.

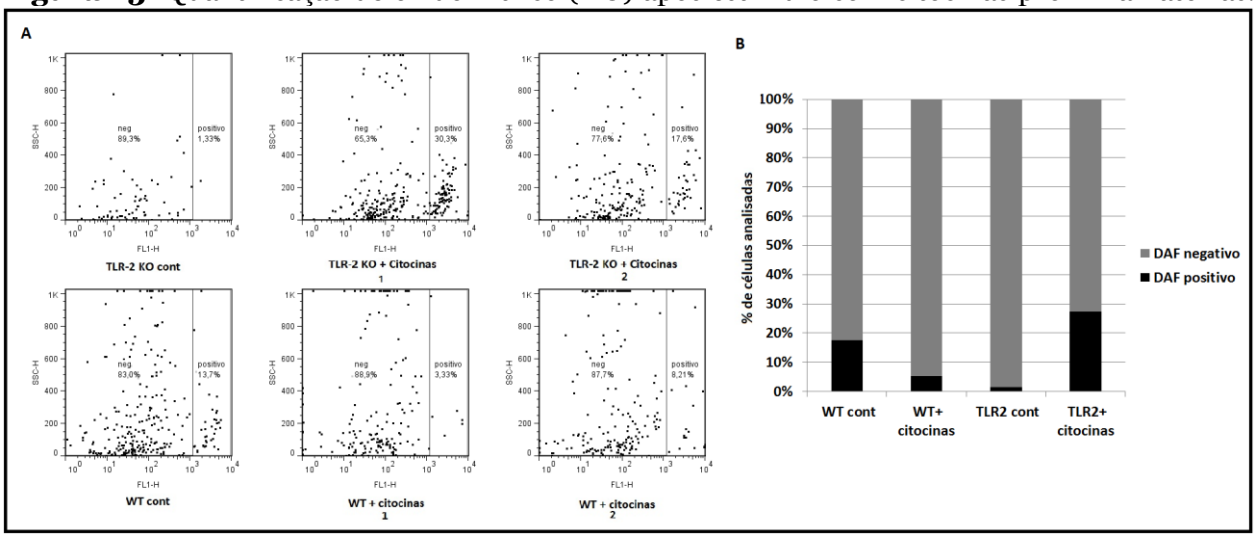


Análise de morte celular de células de ilhotas isoladas após estímulo com IL-1β e IFN-y. A) Histograma representativo da frequência de células de ilhotas de Langehrans marcadas (azul) ou não com anexina (vermelho). B) Gráfico da frequência de células de ilhotas pancreáticas vivas (à esquerda) e mortas (à direita) após o tratamento com citocinas (IL-1β e IFN-y). C) Análise geral de células vivas e mortas. WTcont = grupo controle não tratado com citocinas , WT+ citocinas = grupo WT tratado com citocinas, TLR-2 cont = grupo TLR-2 KO controle não tratado com citocinas, TLR-2 + citocinas = grupo TLR-2 KO tratado com citocinas. N= 120 ilhotas por grupo. Valores expressos como frequência média (%) ± desvio padrão.

5.12 Quantificação indireta de óxido nítrico após o ensaio de morte das ilhotas

Estudos têm demonstrado o papel de IL-1β e IFN-y na ativação de iNOS e consequentemente produção de NO no processo de destruição de células β pancreáticas, via sinalização por NF-kB (83, 84). Tendo em conta estas informações, padronizou-se a quantificação de NO por DAF-FM após o ensaio de morte induzida por citocinas. Na figura 23 está representada a quantificação do NO após 3 dias de tratamento das ilhotas pancreáticas de camundongos WT e TLR-2 KO com o coquetel de citocinas. Foi observada uma maior produção de NO nas células do grupo TLR-2 KO tratadas com o coquetel em relação ao WT.

Figura 23- Quantificação de óxido nítrico (NO) após estímulo com citocinas pró-inflamatórias.



Quantificação de óxido nítrico (NO) após estímulo com citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e IFN-y) em células derivadas de ilhotas de animais WT e TLR2 KO. A) *Dot plot*s representativos da frequência de células de ilhotas de Langehrans 3 dias após o tratamento com citocinas. B) Análise geral da frequência de células de ilhotas pancreáticas dos camundongos WT e TLR-2 estimulados ou não com citocinas. A porcentagem de células DAF positivo está representado na cor vermelha e DAF negativo na cor azul. WTcont = grupo controle não tratado com citocinas , WT+ citocinas = grupo WT tratado com citocinas, TLR-2 cont = grupo TLR-2 KO controle não tratado com citocinas, TLR-2 + citocinas = grupo TLR-2 KO tratado com citocinas.

6 DISCUSSÃO

Segundo a Federação Internacional de Diabetes, o número de pacientes com diabetes do tipo 1 tem aumentado nos últimos anos. Em acréscimo, índices obtidos indicam o aumento desse número em todos os continentes. Na tentativa de controlar esta epidemia, muitas medidas e estudos preventivos estão sendo feitos visando impedir ou retardar este prognóstico, promovendo, por exemplo, a reeducação alimentar e o uso de terapias celulares. Diversas pesquisas recentes têm relacionado a dieta alimentar com o sistema imune. Estudos demonstram que introduzindo suplementos de vitamina D em camundongos NOD é possível bloquear o surgimento de insulite em ilhotas pancreáticas (85). A suplementação com vitamina D na alimentação de crianças com predisposição para desenvolver DMT1 promoveu também retardo do desenvolvimento da doença, em comparação a crianças que não receberam esse suplemento (86). Além disso, outros estudos sugerem que o tratamento imunossupressor com MSCs em pacientes recém-diagnosticados também pode retardar o aparecimento da doença ao manter as células β pancreáticas residuais funcionais (81). Interessantemente, outros estudos sugerem o tratamento de pacientes com doses baixas múltiplas de anticorpos anti-CD3 logo após o inicio da resposta imune que origina a insulite. Em concordância, estudos apontam que anticorpos anti-CD3 são capazes de reagir contra linfócitos T autoreativos induzindo uma imunotolerância para antígenos das ilhotas além de diminui ou mesmo bloquear o desenvolvimento da doença em camundongos NOD (87). Por outro lado, uma vez estabelecida a doença, outros pesquisadores estudam a possibilidade de reverter o quadro clínico do paciente com o transplante de ilhotas. Ainda, outros pesquisadores estudam formas de amenizar as complicações que surgem nos pacientes diabéticos visando melhorar a qualidade de vida desses pacientes (89, 90).

Diversos modelos têm sido desenvolvidos com o objetivo de induzir o DMT1 experimental. Um método estabelecido consiste no uso de diferentes tipos de toxinas (toxina diftérica, aloxana, pentamicina e estreptozotocina) que causam destruição das células β pancreáticas (3, 10). A STZ tem a capacidade de induzir diabetes por dois modelos diferentes: um modelo de dose única e outro de múltiplas doses, MLD-STZ (90). Segundo a literatura, a patogênese do modelo de dose única se baseia no papel citotóxico da droga (90). Já no modelo de MLD-STZ, ocorre a lesão das células β levando

à exposição de auto-antígenos e consequentemente, ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória autoimune contra esses antígenos (1). No presente trabalho foi utilizado o modelo de MLD-STZ com o objetivo de estudar a participação dos TLR-2 TLR-4 e molécula adaptadora MyD88 no processo inflamatório que leva ao desenvolvimento de DMT1. Após a indução de DMT-1 nos camundongos KO para TLR-2, TLR-4 e MyD 88 foi observado uma maior gravidade da doença nos animais TLR-2 KO, por apresentarem maior perda de peso, elevada hiperglicemia, maior resistência no teste de tolerância à glicose e predominância do nível mais grave de insulite. A doença foi menos grave nos camundongos TLR-4 KO e MyD88 KO e foi semelhante ao desenvolvido nos camundongos WT, caracterizada por menor perda de peso, uma hiperglicemia e resistência à glicose menos acentuada, acompanhada de níveis menos grave de insulite. Baseado nesses resultados, o foco deste trabalho foi principalmente os camundongos TLR-2KO e WT.

Segundo a literatura, quando auto-antígenos de células β pancreáticas são expostos na circulação, eles são apresentados por APCs a linfócitos T, gerando uma resposta auto-imune. A partir disto, células inflamatórias migram então para as ilhotas iniciando uma resposta inflamatória e desenvolvendo a insulite (38, 39, 76). Durante a patogênese da DMT1 citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IFN-γ, IL-2 e IL-1β são produzidos em elevada concentração. No processo, também participam linfócitos citotóxicos produzindo granzimas e perforinas que juntamente com as citocinas atuam destruindo progressivamente mais células β de ilhotas pancreáticas (1, 41, 43). Nos camundongos TLR-2 KO diabéticos, ao contrario dos WT diabéticos, também foram detectadas elevadas concentrações de IL-2, IFN-γ e IL-17 no soro, sugestivo de uma maior inflamação nos TLR-2 KO, confirmando dados iniciais destes animais referentes ao grau de gravidade do diabetes.

Estudos feitos em camundongos NOD mostram que macrófagos estimulados com agonistas do receptor TLR-2 suprimiram o diabetes, produzindo elevadas quantidades de TGF-β, aumentando a frequência de células T reguladoras Foxp3+ (91). A análise periférica de linfócitos mostrou uma maior frequência de células T CD8+, células T CD4+ e uma menor frequência de células T reguladoras Foxp3+ nos TLR-2KO diabéticos quando comparados aos WT diabéticos, apesar de não ter sido observado diferença na concentração de TGF-β entre os dois grupos. Porém, no pâncreas dos TLR-2 KO

diabéticos também foi observado uma maior porcentagem de células CD11b+. Esses dados podem estar relacionados à exacerbação da doença observada nos animais na ausência do TLR-2.

A morte de células β pancreáticas também pode ser desencadeada por Fas ao se ligar no FasL e por um desbalanço de proteínas anti- e pró-apotóticas causando destruição do DNA e citotoxicidade (92, 93). Trabalhos já publicados mostram que no DMT1 induzido por MLD-STZ ocorre uma diminuição na expressão de proteínas anti- e um aumento de proteínas pró-apoptóticas acompanhado por um aumento no nível de caspase 3 (94, 95, 96). Adiante, estudos mostram que uma maior expressão de proteínas da família Bcl-2 esteja relacionada a uma maior proteção das células de ilhotas pancreáticas e regulação da ativação de caspase 3 via citocromo c (97, 98, 99). Nas ilhotas de camundongos TLR-2 KO diabéticos de modo semelhante aos outros grupos (WT, TLR-4 KO e MyD 88 KO), foi observado uma maior expressão de Bcl-2 em relação ao Bax conferindo uma proteção nos dias 7 e 12 . Interessantemente, a relação de Bcl-2/Bax inverteu aos 21 dias somente nos TLR-2 KO diabéticos, sendo observado um aumento na expressão de Bax nestes animais. Além do mais, também foi observado um aumento crescente da expressão de caspase 3 fosforilada nos camundongos TLR-2 KO no intervalo de tempo de 7 a 21dias. Esses dados sugerem, portanto que o perfil de apoptose possivelmente contribuiu para o perfil do desenvolvimento da doença observado nos camundongos TLR-2 KO.

Por outro lado, ao longo do trabalho questionou-se se o pior quadro clínico desenvolvido nos camundongos TLR-2 KO seria devido à maior suscetibilidade desses animais a STZ. Alguns trabalhos demostraram que na indução de DMT1 por STZ, uma das funções da STZ é se ligar no Glut-2 bloqueando o transporte de glicose (100). Nossos resultados de imunohistoquímica mostraram que os TLR-2 KO controles, não diabéticos, expressavam maior porcentagem de Glut-2 em relação aos outros animais. Desta forma sugere-se que, os animais TLR-2 KO sejam mais sensíveis a STZ. Assim, esta maior sensibilidade a STZ somados aos resultados discutidos anteriormente podem explicar alguns aspectos do perfil de exacerbação da doença visto nos animais TLR-2 KO diabéticos.

De acordo com a literatura, na ausência do receptor TLR-2, é possível que outros TLRs que sinalizam por vias dependente e independente da molécula MyD88 sejam

ativados. E, de modo sinérgico esses receptores podem estimular o fator NF-kB. A ativação de NF-kB por sua vez pode promover um ambiente pró-inflamatório e induzir a iNOS a aumentar a produção de NO, aumentando desta forma a atividade de caspase-3 e apoptose de células β pancreáticas (101, 102). Desta forma, uma das causas de morte pode envolver a produção de NO. O NO é visto como sendo um composto citoprotetor (103). Entretanto, quando ele é produzido juntamente com superóxido na presença de enzimas como NADPH oxidase e mieloperoxidase são formados compostos com alto poder de oxidação (peroxinitritos) (104, 105, 106) que podem contribuir para a piora da doença. Nos experimentos *in vivo*, não foram observados diferenças estatísticas da produção de NO a partir de extratos pancreáticos. Realizou-se então, ensaios *in vitro* no qual as ilhotas foram estimuladas com um coquetel de citocinas (IL-1β+IFN-γ) visando esclarecer se a produção de NO poderia estar associado à morte de células β. Nossos resultados mostraram uma maior produção de NO nas células β das ilhotas do grupo TLR-2 KO em comparação ao grupo WT. Interessantemente, esses resultados corroboram os resultados anteriores obtidos no ensaio de morte de células de ilhotas isoladas também tratados com o coquetel de citocinas. Desta forma, possivelmente, a ausência do receptor TLR-2 também contribua para esse aumento de NO e com isto esteja relacionado à maior porcentagem de células β mortas verificadas no grupo TLR-2 KO.

Resumindo, a deficiência do TLR-2 resultou no desenvolvimento exacerbado do DMT1, caracterizado por maior perda de peso, elevada glicemia, maior destruição de células β pancreáticas, acompanhado de níveis elevados de IL-2, IFN-γ e IL-17 no soro e baixa frequência de linfócitos T reguladoras. Deste modo, sugere-se que os TLR-2 têm um papel importante na modulação da resposta imune desenvolvida nesta doença.

7 CONCLUSÃO

Apesar de diferentes trabalhos mostrarem que os receptores TLR-2 podem participar em alguns casos exacerbando a patogênese do DMT1 ao ativar vias de produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, TNF e IL-6 (59). Este trabalho mostrou que os camundongos TLR-2KO diabéticos aos 21 dias após o tratamento pelo MLD-STZ desenvolveram um nível mais grave de insulite e apresentaram maior frequência de células CD11b+ nos pâncreas. Adicionalmente, estes animais apresentaram maior expressão de Bax e caspase 3 ativada nas ilhotas. Na periferia, observou-se elevada concentração de IL-2, IFN-γ e IL-17 e menor frequência de células T reguladoras Foxp3+. Além disso, após estimulação das ilhotas com o coquetel de citocinas (IL-1β+IFN-γ), observou-se maior produção de NO e maior porcentagem de células mortas nas ilhotas dos animais TLR-2 KO.

É possível que todos esses fatores contribuam direta e/ou indiretamente para exacerbação da doença desenvolvida nesses animais e que a ativação da via de sinalização dependente de TLR-2 possa modular a resposta inflamatória autoimune durante o desenvolvimento da DMT-1 experimental induzida por MLD-STZ.

REFERÊNCIAS*

1. Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. Dev Immunol. 1998;6(1-2):119-28.

2. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. Immunity. 2010 Apr;32(4):457-67.

3. Robbins SR. Patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

4. Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

5. Centers for Disease Control and Prevention. (Accessed 2008 Feb 9). Disponível em: http://apps.nccd.cdc.gov/ DDTSTRS/template/ndfs_2005.pdf. .

6. Jane CE, Robyn ML, Mark SC, Hilary JB. Population density determines the direction of the association between ambient ultraviolet radiation and type 1 diabetes incidence. Pediatr Diabetes. 2010 Sep;11(6):394-402.

7. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Chase HP, Eisenbarth GS Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type I diabetes. J Autoimmun. 1996. Jun;9(3):379-83.

8. Andréoletti L, Hober D, Hober-Vandenberghe C, Belaich S, Vantyghem MC, Lefebvre J, Wattré P. Detection of Coxsackie B Virus RNA sequences in whole blood samples from adult patients at the onset of type I diabetes mellitus. J Med Virol. 1997 Jun;52(2):121-7.

9. Atkinson MA.Molecular mimicry and the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus: still just an attractive hypothesis. Ann Med. 1997 Oct;29(5):393-9.

10. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulitis: new model of diabetes mellitus. 1 Science. 1976 Jul 30. 193(4251):415-7.

11. Mooradian AD. Obesity: A rational target for managing diabetes mellitus. Growth Horm IGF Res 2001; 11(Suppl. A):S79-S83.

12. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. Diabetes. 2002;51:455-461.

*De acordo com Internacional Comittee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. (updated 2011 Jul 15). Avaliable from http://www.icmje.org.

13. Thorand B, Lo¨wel H, Schneider A, et al. C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitusamong middle-aged men: Results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984-1998. Arch Intern Med. 2003;163:93-9.

14. Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: An overview. Ann Periodontol. 2001;6:91-98.

15. Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS, Adamis AP. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. FASEB J. 2004 Sep;18(12):1450-2. Epub 2004 Jul 1.

16. Izuora KE, Chase HP, Jackson WE, et al. Inflammatory markers and diabetic retinopathy in type 1 diabetes. Diabetes Care. 2005;28:714-5.

17. Meleth AD, Agron E, Chan CC, et al. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46:4295-4301.

18. Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH. "Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury," *Kidney International*. 2004; 65 (1): 116– 28.

19. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH. Macrophages in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: potential role in renal fibrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004. 19(12):2987–96.

20. Kanamori H, Matsubara T, Mima A et al. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007. 360(4):772–7.

21. Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. Diabetes Care. 1992 Dec;15(12):1835-43.

22. Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: An overview. Ann Periodontol. 2001;6:91-8.

23. Seljeflot I, Larsen JR, Dahl-Jørgensen K, Hanssen KF, Arnesen H. Seljeflot I, Larsen JR, Dahl-Jørgensen K, Hanssen KF, Arnesen H. Fibrinolytic activity is highly influenced by long-term glycemic control in Type 1 diabetic patients. J Thromb Haemost. 2006 Mar;4(3):686-8.

24. Larsen J, Brekke M, Sandvik L, Arnesen H, Hanssen KF, Dahl-Jørgensen K. Silent coronary atheromatosis in type-1 diabetic patients and relation to long-termglycemic control. Diabetes. 2002; 51: 2637–41.

25. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. Sep 10.10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. N Engl J Med. 2008 Oct 9;359(15):1577-89.

26. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL.Platelet Dysfunction in Type 2 Diabetes. Diabetes Care. 2001; 24(8):1476-85.

27. Eibl N, Krugluger W, Streit G, Schrattbauer K, Hopmeier P, Schernthaner G. Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type-2 diabetes. Eur J Clin Invest. 2004 Mar;34(3):205-9.

28. Yngen M, Norhammar A, Hjemdahl P, Wallén NH. Effects of improved metabolic control on platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus following coronary angioplasty. Diab Vasc Dis Res.2006 May;3(1):52-6.

29. Serbedžija P, Ishii DN. Insulin and insulin-like growth factor prevent brain atrophy and cognitive impairment in diabetic rats. Indian J Endocrinol Metab. 2012 Dec;16(Suppl 3):S601-10.

30. Auwerx J, Dequeker J, Bouillon R, Geusens P, Nijs J. Mineral metabolism and bone mass at peripheral and axial skeleton in diabetes mellitus. Diabetes 1988:37:8–12.

31. Carnevale V, Romagnoli E, D'Erasmo E. Skeletal involvement in patients with diabetes mellitus. Diabetes Metab Res Rev 2004:20:196–204.

32. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E *et al*. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes Care. 2000 Oct:23(10):1516-26.

33. Kantarova, D. e M. Buc. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. Physiol Res. 2007;56(3);255-66.

34. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2005.pdf>.

35. Milec, E. A. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2006. p. 1-154.

36. DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. Diabet Med. 2006 Aug;23(8):857-66.

37. International Diabetes Federation. Disponível em: http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012.

38. Gepts W, Lecompte PM. The pancreatic islets in diabetes. Am J Med. 1981 Jan;70(1):105-15.

39. Roep, BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. Diabetologia. 2003 Mar;46(3):305-21.

40. Saxena V, Ondr JK, Magnusen AF, Munn DH, Katz JD. The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse. J Immunol. 2007 Oct 15;179(8)5041-53.

41. Shimizu J, Kanagawa O, Unanue ER. Presentation of beta-cell antigens to CD4+ and CD8+ T cells of non-obese diabetic mice. J Immunol. Aug 1 1993;151(3):1723-30.

42. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):792-8.

43. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldmann M. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. Nature. 1987 Mar 19-25;326(6110):304-6.

44. O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, Lund T, Kioussis D, Takei F, Baird J, Cooke A. Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. Eur J Immunol. 1991 May;21(5)p.1171-80.

45. Corbett JA, McDaniel ML. Intraislet release of interleukin 1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. J Exp Med.1995 Feb 1; 181(2)559-68.

46. Christie MR, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, Delovitch TL.Detection of pancreatic islet 64,000 M(r) autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. J Clin Invest. 1993 Jul;92(1):240-8.

47. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. Diabetes, 2005 Dec; 54 Suppl (2) p.S52-61.

48. Reijonen H, Daniels TL, Lernmark A, Nepom GT. GAD65-specific autoantibodies enhance the presentation of an immunodominant T-cell epitope from GAD65. Diabetes. 2000 Oct:49(10):1621-6.

49. Christie MR, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, Delovitch TL. Detection of pancreatic islet 64,000 M(r) autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. J Clin Invest, 1993 Jul;92(1):240-8.

50. McGettrick AF, O'Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. Curr Opin Immunol. 2010 Feb;22(1):20-7.

51. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell. 1996 Sep 20v; 86(6):973-83.

52. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216.

53. Khoo JJ, Forster S, Mansell A. Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. J Interferon Cytokine Res. 2011 Jan;31(1)13-25.

54. Devaraj S, Dasu MR, Park SH, Jialal I. Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. Diabetologia. Aug 2009;52(8)1665-1668.

55. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. Genes Cells. 2001 Sep;6(9)733-42.

56. Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. Science. 2005 Sep 16;309(5742):1854-7.

57. Karumuthil-Melethil S, Perez N, Li R, Vasu C. Induction of innate immune response through TLR2 and dectin 1 prevents type 1 diabetes. J Immunol. 2008 Dec 15;181(12)8323-34.

58. Manicassamy S, Ravindran R, Deng J, Oluoch H, Denning TL, Kasturi SP, Rosenthal KM, Evavold BD, Pulendran B. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. Nat Med. 2009 Apr;15(4)401-9.

59. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. J Clin Endocrinol Metab 2008 Feb;93(2)578-83.

60. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol, 2003;21:335-76.

61. McGettrick AF, O'Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. Curr Opin Immunol. 2010 Feb;22(1):20-27.

62. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T *et al.* A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. J Immunol. 2004 Apr 15;172(8):4733-43.

63. Wenink MH, Santegoets KC, Broen JC et al. TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. J Immunol. 2009 Dec 1; 183(11):6960-6970.

64. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. Nature. 2008 Oct 23;v.455(7216):1109-1113.

65. Aumeunier A, Grela F, Ramadan A, et al. Systemic Toll-like receptor stimulation suppresses experimental allergic asthma and autoimmune diabetes in NOD mice. PLoS One. 2010; 5,(7)11484.

66. Vives-Pi M, Somoza N, Fernández-Alvarez J, et al. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. Clin Exp Immunol. 2003 Aug;133(2)208-18.

67. Wen L, Peng J, Li Z, Wong FS. The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets. J Immunol, 2004 Mar;172(5)3173-80.

68. Paroni F, Domsgen E, Maedler K. CXCL10- a path to beta-cell death. Islets 2009 Nov-Dec;1(3)256-259.

69. Eldor R, Yeffet A, Baum K, et al. Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 28;103(13)5072-77.

70. Wikimedia Commons. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streptozotocin_Structure_NTP.png .

71. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β-cell function. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):788-91.

72. Emre Y, Hurtaud C, Karaca M, Nubel T, Zavala F, Ricquier D. Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: how macrophage-mediated insulitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Nov 27;104(48):19085-90. Epub 2007 Nov 15.

73. Curi R. Cultura de células: história e perspectivas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

74. Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. Chem Pharm Bull (Tokyo). Feb 1998;46(2):373-5.

75. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. Anal Chem. Jul 1 1998;70(13)2446-53.

76. Leiter HE. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulitis in C57BL mice: Influence of inbred background sex, and thymus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Jan;79(2):630-4.

77. Kriegel MA, Rathinam C, Flavell RA. Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c+ CD11b+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 28;109(9):3457-62.

78. Zhang J, Huang Z, Sun R, Tian Z, Wei H. IFN-γ induced by IL-12 administration prevents diabetes by inhibiting pathogenic IL-17 production in NOD mice. J Autoimmun. 2012 Feb;38(1):20-28.

79. Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B, Barrat F, Lehuen A. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. Nat Med. 2013 Jan; 19(1):65-73. Epub 2012 Dec 16.

80. Yaochite JN, Caliari-Oliveira C, Davanso MR, et al. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell population sinterfere in the experimental autoimune diabetes pathogenesis. Immunobiology. 2013 Mar;218(3):338-52.

81. Bassi ÊJ, Moraes-Vieira PM, Moreira-Sá CS, el al. Immune Regulatory Properties of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Experimental Autoimmune Diabetes. Diabetes. 2012 Oct;61(10):2534-45. Epub 2012 Jun 11.

82. Hässler S, Peltonen L, Sandler S, Winqvist O. Aire Deficiency Causes Increased Susceptibility to Streptozotocin-induced Murine Type 1 Diabetes. Scandinavian Journal of Immunology. 2008;67569–80.

83. Cho JM, Chang SY, Kim DB, Needs PW, Jo YH, Kim MJ. Effects of physiological quercetin metabolites on interleukin-1β-induced inducible NOS expression. Nutr Biochem. 2012 Nov;23(11):1394-402.

84. Kacheva S, Lenzen S, Gurgul-Convey E. Differential effects of proinflammatory cytokines on cell death and ER stress in insulin-secreting INS1E cells and the involvement of nitric oxide. Cytokine 2011 Aug;55(2)195-201.

85. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. Diabetes. 2002 May;51(5):1367-74.

86. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM. Lancet. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. 2001 Nov;358(9292):1500-3.

87. Bach JF, Chatenoud L. A historical view from thirty eventful years of immunotherapy in autoimmune diabetes. Semin Immunol. 2011 Jun;23(3):174-181.

88. Van Dellen D, Worthington J, Mitu-Pretorian OM, Ghazanfar A, Forgacs B, Pararajasingam R, Campbell B, Parrott NR, Augustine T, Tavakoli A. Mortality in diabetes: pancreas transplantation is associated with significant survival benefit. Nephrol Dial Transplant. 2013 May;28(5):1315-22.

89. Joshi A, Varthakavi P, Chadha M, Bhagwat N. A study of bone mineral density and its determinants in type 1 diabetes mellitus. J Osteoporos. 2013;2013:397814. Epub 2013 Mar.

90. Muller YD, Golshayan D, Ehirchiou D et al. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. Diabetes. 2011;60:2331-40.

91. Burton OT, Zaccone P, Phillips JM, De La Peña H, Fehérvári Z, Azuma M, Gibbs S, Stockinger B, Cooke A. Roles for TGF-beta and programmed cell death 1 ligand 1 in regulatory T cell expansion and diabetes suppression by zymosan in nonobese diabetic mice. J Immunol. 2010 Sep 1. 185(5):2754-62.

92. Varanasi V, Avanesyan L, Schumann DM, Chervonsky AV. Cytotoxic mechanisms employed by mouse T cells to destroy pancreatic β-cells.; Diabetes. 2012 Nov;61(11):2862-70. Epub 2012 Jul 6.

93. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jan;9(1):47-59.

94. Ruan Q. The microRNA-21-PDCD4 axis prevents type 1 diabetes by blocking pancreatic beta cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 19;108(29):12030-35. Epub 2011 Jul 5.

95. Lin S, Yang J, Wu G, Liu M, Lv Q, Yang Q, Hu J. Inhibitory effects of taurine on STZ-induced apoptosis of pancreatic islet cells. Adv Exp Med Biol. 2013;775:287-97.

96. Yu W, Wu J, Cai F, Xiang J, Zha W, Fan D, Guo S, Ming Z, Liu C;Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. PLoS One. 2012;7(12):e52013. Epub 2012 Dec 14.

97. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Strynadka K, Ju Q, Edelstein D, Brownlee M, Korbutt GS, Rajotte RV. Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. Diabetes. 1999 Jun;48(6):1223-29.

98. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 1998 Aug 28;281(5381):1322-26.

99. Terra FL. Mecnismos moleculares envolvidos em citoproteção e transformação maligna de células-beta pancreáticas. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2013.

100. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB.STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells.Diabetes. 1994 Nov;43(11):1326-33.

101. Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, Trigilio J, Shin HS, Valentine C, Hellman J. MyD88-Dependent and MyD88-Independent Pathways in Synergy, Priming, and Tolerance between TLR Agonists. J Immunol. 2007 Jan 15;178(2):1164-71.

102. Ingaramo PI, Ronco MT, Francés DE, Monti JA, Pisani GB, Ceballos MP, Galleano M, Carrillo MC, Carnovale CE. Tumor necrosis fator alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. Mol Immunol. 2011 Jul;48:1397-1407.

103. Glantzounis GK, Rocks SA, Sheth H, Knight I, Salacinski HJ, Davidson BR, Winyard PG, Seifalian AM.Formation and role of plasma S-nitrosothiols in liver ischemia-reperfusion injury.Free Radic Biol Med. 2007 Mar 1,5; 42(6):882-92.

104. Abbas A. Imunobiologia celular a molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

105. Curcumin health. [cited from 20 jun. 2012]. Disponivel em: http://www.curcuminhealth.info/category/newsletters/ janeiro de 2005.

106. Peres W. Radicais livres em níveis biológicos. Educat; 1994.

107. Karabatas LM, Pastorale C, de Bruno LF, Maschi F, Pivetta OH, Lombardo YB, Chemes H, Basabe JC. Early manifestations in multiple-low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. Pancreas. 2005 May;30(4):318-24.

APÊNDICE - Artigo científico publicado

ORIGINAL ARTICLE

Immune Regulatory Properties of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Experimental Autoimmune Diabetes

Ênio J. Bassi,[1] Pedro M.M. Moraes-Vieira,[1] Carla S.R. Moreira-Sá,[1] Danilo C. Almeida,[2] Leonardo M. Vieira,[1] Cláudia S. Cunha,[1] Meire I. Hiyane,[1] Alexandre S. Basso,[3] Alvaro Pacheco-Silva,[2] and Niels O.S. Câmara[1]

Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) display immunosuppressive properties, suggesting a promising therapeutic application in several autoimmune diseases, but their role in type 1 diabetes (T1D) remains largely unexplored. The aim of this study was to investigate the immune regulatory properties of allogeneic ADMSC therapy in T cell–mediated autoimmune diabetes in NOD mice. ADMSC treatment reversed the hyperglycemia of early-onset diabetes in 78% of diabetic NOD mice, and this effect was associated with higher serum insulin, amylin, and glucagon-like peptide 1 levels compared with untreated controls. This improved outcome was associated with downregulation of the CD4$^+$ Th1-biased immune response and expansion of regulatory T cells (Tregs) in the pancreatic lymph nodes. Within the pancreas, inflammatory cell infiltration and interferon-γ levels were reduced, while insulin, pancreatic duodenal homeobox-1, and active transforming growth factor-β1 expression were increased. In vitro, ADMSCs induced the expansion/proliferation of Tregs in a cell contact–dependent manner mediated by programmed death ligand 1. In summary, ADMSC therapy efficiently ameliorates autoimmune diabetes pathogenesis in diabetic NOD mice by attenuating the Th1 immune response concomitant with the expansion/proliferation of Tregs, thereby contributing to the maintenance of functional β-cells. Thus, this study may provide a new perspective for the development of ADMSC-based cellular therapies for T1D. ***Diabetes* 61:2534–2545, 2012**

Autoimmune type 1 diabetes (T1D) is an inflammatory T cell–mediated autoimmune destruction of insulin-producing β-cells at the pancreatic islets (1). This process is mainly mediated by Th1-effector CD4$^+$ cells and by proinflammatory cytokines, such as interferon (IFN)-γ, interleukin (IL)-2, and tumor necrosis factor (TNF)-α (2). Some studies show that the treatment of nonobese diabetic (NOD) mice with anti–IFN-γ antibody prevents the development of diabetes (3), and the transgenic expression of this cytokine in diabetes-resistant mice results in disease development (4). In addition, the in vitro combination of IL-1β, IFN-γ, and TNF-α has been shown to increase the β-cell vulnerability to autoimmune destruction (5). The autoimmune process in T1D is also composed of regulatory components, such as CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ regulatory T cells (Tregs), which are important for suppressing the activation of the immune system and thereby maintaining homeostasis and tolerance to self-antigens (6). The reduction of Treg frequency by disrupting the B7/CD28 pathway could accelerate the onset of autoimmune diabetes in NOD mice (7), while the expansion of these cells in pancreatic lymph nodes (PLNs) was correlated with disease resistance (8). Several successful experimental therapies for T1D show a correlation between a better outcome and an increased frequency of these cells (9–11).

As a result of their immune suppressive/regulatory and regenerative potential, mesenchymal stem cells (MSCs) have emerged as a potential new therapy for T1D. Several studies from the past few years show that MSCs are capable of suppressing the immune response by inhibiting the maturation of dendritic cells and suppressing the proliferation/function of T cells, B cells, and NK cells (12–15). Moreover, MSCs have been shown to induce the expansion of CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ Tregs (16–18), and some studies evaluate the therapeutic effect of allogeneic or syngeneic bone marrow–derived MSCs in the prevention or reversion of autoimmune diabetes in several experimental models (19–26). It is important that adipose-derived (AD)MSCs, which can be isolated from fat tissue after liposuction and easily expanded in culture, have become an attractive source of MSCs for cell therapy. In addition, it has been shown that ADMSCs can suppress in vivo T-cell autoimmune responses in graft-versus-host disease and some experimental models of autoimmune diseases, such as collagen-induced arthritis, experimental colitis, and autoimmune encephalomyelitis (27–29). However, the immunosuppressive effect of ADMSCs in the treatment of T1D remains largely unexplored. In this study, we evaluated the therapeutic potential of ADMSCs in ameliorating the recent onset of experimental autoimmune diabetes in a NOD mouse model with regard to their immune regulatory properties. Therefore, we investigated the potential of ADMSC therapy to simultaneously suppress the Th1 CD4 T cell–mediated immune response involved in this disease and promote the expansion of Tregs.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

NOD (H2-A^{g7}) mice were purchased from Taconic (Germantown, NY), and Balb/c mice (H2-A^d) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Professor Alexandre Salgado Basso (Universidade Federal de São Paulo) provided the C57BL/6 Foxp3-GFP knock-in mice. All protocols were conducted in adherence to the Brazilian Committee for Experimental Animals and were approved by the institutional ethics committee on animal use of the University of São Paulo.

From the [1]Department of Immunology, Laboratory of Transplantation Immunobiology, Institute of Biomedical Sciences IV, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; the [2]Department of Medicine, Division of Nephrology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; and the [3]Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.
Corresponding author: Niels O.S. Câmara, niels@icb.usp.br.
Received 20 June 2011 and accepted 9 April 2012.
DOI: 10.2337/db11-0844
This article contains Supplementary Data online at http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db11-0844/-/DC1.
© 2012 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/ for details.