UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticos em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Gislane Lelis Vilela de Oliveira

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticos em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências aplicadas à Farmácia

Orientada: Gislane Lelis Vilela de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Ribeirão Preto

2008

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

Oliveira, Gislane Lelis Vilela de

Avaliação da expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticos em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto, 2008.

163 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Castro, Fabíola Attié de

1. apoptose. 2. autoimunidade. 3. *diabetes mellitus* tipo 1. 4. esclerose múltipla. 5. transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gislane Lelis Vilela de Oliveira

Avaliação da expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticos em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Luiz e Sonia com imensa gratidão

e à memória de minha avó Lina Vilas Boas Lelis Vilela

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a Deus pela minha existência e por toda força e coragem que tem me dado em todos os momentos de minha vida;

Aos meus pais por tudo o que sou hoje e por ter me proporcionado condições de chegar até aqui. E também à minha irmã Gisele por toda força e amizade;

Aos pacientes e aos indivíduos controles que participaram deste projeto, pois sem estes esta pesquisa não seria possível;

À minha orientadora Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro pela disponibilidade, atenção, incentivo, paciência e por todos os ensinamentos;

À minha co-orientadora Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias pela amizade, por todos os ensinamentos e pela imensa ajuda que me deu no decorrer desses dois anos de mestrado;

Ao Prof. Dr. Julio César Voltarelli pela colaboração e cessão das amostras dos pacientes;

Às amigas e colaboradoras Aline Fernanda Ferreira, Elainy Patrícia Lino Gasparotto e Raquel Tognon por toda ajuda, paciência, compreensão e apoio;

À Profa. Dra. Simone Kashima Haddad pela colaboração e por todo auxílio prestado ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas pela colaboração e permissão para que os experimentos de biologia molecular fossem realizados no Centro Regional de Hemoterapia;

Às funcionárias e amigas do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro Evandra Strazza Rodrigues e Rochele Azevedo por toda ajuda e apoio nesses dois anos;

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular pela ajuda, paciência e apoio: Julio Edward Hough Monteiro, Larissa Deadame de Figueiredo Nicolete, Maria Fernanda Amarante, Rodrigo Haddad e Tathiane Maistro Malta

À todos do Laboratório de Biologia Celular e à Aline Cristina Garcia Silva, Rosane Bolzoni e Natália Canevari Valentini pela ajuda em alguns experimentos;

À Giovana Mussi Polachini do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pelo auxílio na padronização da técnica de extração de proteínas e à Profa. Dra. Heloísa Helena Tajara da Silva por ter permitido a utilização deste mesmo laboratório;

Aos professores do Laboratório de Bioquímica Dr. Sérgio Akira Uyemura e Dra. Andréia Machado Leopoldino pela disponibilização da sala de revelação e pela ajuda. E também à Flávia Amoroso Matos do mesmo laboratório por algumas dicas e apoio;

À Regina Albuquerque pelo auxílio com as figuras do *western-blotting*;

À Marcella Daruge Grando, Zita Maria de Oliveira Gregório e Solange Bocardo por todo auxílio e presteza nos experimentos realizados no Laboratório de Hematologia da FCFRP;

Às amigas Livia Regatieri, Anna Carolina Raduan e Fernanda Carregaro por toda amizade, força e apoio incondicionais a todos os momentos durante o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Muito Obrigada a todos!

"Na Idade Média, as pessoas acreditavam que a Terra era plana, porque elas tinham ao menos a evidência de seus sentidos; nós acreditamos que ela é redonda não porque um por cento de nós pôde dar as razões científicas para uma crença tão fantástica, mas porque a ciência moderna nos convenceu de que nada que é óbvio é verdadeiro, e que tudo que é mágico, improvável, extraordinário, gigantesco, microscópico, cruel ou excessivo é científico."

George Bernard Shaw (1856-1950)

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract iii
Lista de figuras v
Lista de tabelas vii
Lista de abreviaturas e siglas ix
Lista de símbolos xi

1. INTRODUÇÃO 2
1.1. Doenças auto-imunes 2
1.2. *Diabetes mellitus* tipo 1 3
1.3. Esclerose múltipla 5
1.4. Apoptose e doenças auto-imunes 7
1.4.1. *Diabetes mellitus* tipo 1 e apoptose 11
1.4.2. Esclerose múltipla e apoptose 12
1.5. Transplante de células-tronco hematopoéticas em doenças auto-imunes 13

2. OBJETIVOS 17
2.1. Geral 17
2.2. Específicos 17

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 19
3.1. Pacientes 19
3.2. Grupo controle 25
3.3. Isolamento de células mononucleares pelo método de Ficoll-Hypaque 28
3.4. Extração de RNA pelo método do TRIzol® 28
3.5. Eletroforese de RNA em gel de agarose 1% 29
3.6. Síntese de cDNA por transcrição reversa 29
3.7. Validação da transcrição reversa 30
3.8. Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real 30
3.9. Extração de proteínas pelo método do TRIzol® 34
3.10. Quantificação de proteínas pelo método de BCA 34
3.11. Quantificação protéica pelo método de *western-blotting* 35
3.12. Análise Estatística 37

4. RESULTADOS 39
4.1. Resultados clínico-laboratoriais 39
4.1.1. *Diabetes mellitus* tipo 1 39
4.1.2. Esclerose múltipla 43
4.2. Resultados de expressão gênica 44
4.2.1. *Diabetes mellitus* tipo 1 45
4.2.1.1. Expressão dos genes da via intrínseca da apoptose 45
4.2.1.2. Expressão dos genes da via extrínseca da apoptose 59
4.2.1.3. Expressão dos genes da Família das IAP 62
4.2.2. Esclerose múltipla 64
4.2.2.1. Expressão dos genes da via intrínseca da apoptose 64
4.2.2.2. Expressão dos genes da via extrínseca da apoptose 77
4.2.2.3. Expressão dos genes da Família das IAP 80
4.3. Comparações e Correlações dos dados clínico-laboratoriais com a expressão gênica 82
4.3.1. *Diabetes mellitus* tipo 1 82
4.3.1.1. Expressão gênica de pacientes em remissão clínica e recaída pós-TACTH 82
4.3.1.2. Correlação da expressão gênica e dados laboratoriais 84
4.3.2. Esclerose múltipla 90
4.3.2.1. Expressão gênica de pacientes em remissão clínica e progressão neurológica pós-TACTH 90
4.3.2.2. Correlação da expressão gênica e EDSS dos pacientes 93
4.4. Resultados de expressão protéica 96
4.4.1. *Diabetes mellitus* tipo 1 96
4.4.1.1. Expressão das proteínas da via intrínseca da apoptose 96
4.4.1.2. Expressão da proteína da via extrínseca c-$FLIP_L$ 101
4.4.2. Esclerose múltipla 102
4.4.2.1. Expressão das proteínas da via intrínseca da apoptose 102
4.4.2.2. Expressão da proteína da via extrínseca c-$FLIP_L$ 106

5. DISCUSSÃO 108
5.1. *Diabetes mellitus* tipo 1 108
5.1.1. Expressão dos genes da via intrínseca da apoptose 109
5.1.2. Expressão dos genes da via extrínseca da apoptose 117
5.1.3. Expressão dos genes da Família das IAP 119
5.1.4. Expressão gênica de pacientes em remissão clínica e recaída pós-TACTH 120
5.1.5. Correlação da expressão gênica e dados laboratoriais 121

5.1.5. Expressão das proteínas das vias intrínseca e extrínseca da apoptose 123
5.2. Esclerose múltipla 124
5.2.1. Expressão dos genes da via intrínseca da apoptose 124
5.2.2. Expressão dos genes da via extrínseca da apoptose 130
5.2.3. Expressão dos genes da Família das IAP 131
5.2.4. Expressão gênica de pacientes em remissão clínica e progressão neurológica pós-TACTH 132
5.2.5. Correlação da expressão gênica e EDSS dos pacientes 133
5.1.5. Expressão das proteínas das vias intrínseca e extrínseca da apoptose 135

6. CONCLUSÕES 138

7. REFERÊNCIAS 141

ANEXOS 160

RESUMO

OLIVEIRA, G. L. V. **Avaliação da expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticos em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas**. 2008. 163f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O *diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) e a esclerose múltipla (EM) são doenças auto-imunes órgão-específicas, inflamatórias, mediadas por células T e B auto-reativas e caracterizadas pela destruição seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina e do sistema nervoso central, respectivamente. Acredita-se que a desregulação da expressão de genes reguladores da maquinaria apoptótica possa contribuir para o desenvolvimento da auto-imunidade, visto que algumas dessas moléculas participam nos processos de tolerância central e periférica de linfócitos auto-reativos. O objetivo deste projeto foi analisar a expressão de moléculas reguladoras das vias intrínseca, extrínseca e da Família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP) em 33 indivíduos saudáveis, 15 pacientes com DM-1 e 18 com EM submetidos à terapia de imunossupressão em altas doses seguida do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (IAD/TACTH). As células mononucleares (CMN) foram isoladas do sangue periférico dos controles e de pacientes nos períodos pré-mobilização (pré-mob), pré-condicionamento (pré-cond), D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-transplante. As CMN foram utilizadas para extração de RNA, síntese de cDNA, quantificação da expressão por PCR em tempo real dos genes *a1*, *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-x_L*, *mcl-1*, *bad*, *bak*, *bax*, *bid*, *bik*, *bim*, *bok*, *noxa*, *fas*, *fasL*, *c-FLIP$_L$*, *cIAP-1* e *cIAP-2* e protéica de Bcl-2, Bcl-x_L, Bak, Bim e c-FLIP$_L$ por *western-blotting*. Os resultados de expressão gênica foram representados por unidades relativas de expressão em medianas nas diferentes amostras. Os pacientes com DM-1 apresentaram diminuição da expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2* (mediana: 0,98; p=0,04), *bcl-w* (0,08; p=0,04), *mcl-1* (1254; p=0,03) e *cIAP-1* (1,24; p=0,003) nas CMN dos pacientes no período pré-mob em relação aos indivíduos saudáveis (medianas: *bcl-2*: 7,58; *bcl-w*: 0,52; *mcl-1*: 1659; *cIAP-1*: 14,5), enquanto a expressão de *cIAP-2* (60,8; p=0,0005) estava aumentada em relação aos controles (23,3). Foi observada redução significativa na expressão dos genes pró-apoptóticos *bad* (0,002; p<0,0001), *bax* (0,01; p=0,002) e *fasL* (1,66; p=0,001) no período pré-mob comparada aos controles sadios (*bad*: 0,23; *bax*: 2,79; *fasL*: 3,56). Os níveis de RNAm de *bid* (0,10; p=0,001) e *bok* (0,72; p=0,006) estavam elevados no pré-mob em relação ao grupo controle (*bid*: 0,004; *bok*: 0,31). As moléculas *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-x_L*, *mcl-1*, *bad*, *bax*, *bok*, *fasL* e *cIAP-1* atingiram níveis de RNAm similares aos controles após o TACTH. Foi verificado que a expressão de *bcl-w*, *cIAP-1* e *noxa* estava maior nos pacientes com DM-1 em remissão quando comparados àqueles em recaída. A diminuição da expressão de *a1*, *bcl-2* e *bcl-w* e o aumento de *fas* e *noxa* correlacionaram-se às porcentagens de hemoglobina glicosilada, concentração de auto-anticorpos GAD65, e aos níveis séricos de peptídeo-C após o transplante. Os pacientes com EM mostraram uma expressão reduzida dos genes anti-apoptóticos *bcl-w* (0,11; p=0,02) e *cIAP-1* (1,87; p=0,04) no pré-mob comparada aos valores dos controles (*bcl-w*: 0,27; *cIAP-1*: 7,75) e maior expressão dos genes *a1* (90,8; p=0,001) e *cIAP-2* (58,8; p=0,009) em relação aos controles (*a1*: 12,7; *cIAP-2*: 22,3). As moléculas pró-apoptóticas *bad* (0,007; p=0,01) e *bax* (0,0007; p=0,004) mostraram menor expressão nas CMN no período pré-mob do que nos controles (*bad*: 0,27; *bax*: 1,24). Os genes *bid* (20,7; p=0,004), *bik* (0,84; p=0,02) e *bok* (1,77; p=0,0001) possuíam maior expressão no período pré-mob em relação aos indivíduos sadios (*bid*: 2,64; *bik*: 0,33; *bok*: 0,26). Não foram observadas diferenças significativas na expressão das moléculas da via extrínseca da apoptose nos pacientes com EM (p>0,05) nos períodos avaliados. Os valores de expressão de *bcl-w*, *bak*, *bax*, *bik*, *bok* e *cIAP-1* atingiram níveis semelhantes aos controles após o transplante. A expressão dos genes *bcl-2*, *cIAP-1*,

bad e *bax* estava maior nos pacientes em remissão da EM quando comparados àqueles em progressão neurológica. O aumento da expressão dos genes pró-apoptóticos *bax*, *bak* e bim_{EL} correlacionou-se inversamente aos valores de EDSS dos pacientes com EM após o TACTH. Os resultados de expressão protéica foram equivalentes aos de expressão gênica nas duas doenças, com exceção dos dados das proteínas Bcl-2 e Bim. Em conjunto, os resultados demonstraram a desregulação da expressão de várias moléculas anti- e pró-apoptóticas nas CMN dos pacientes com DM-1 e EM. Esses achados sugerem a associação de alterações nos processos de apoptose celular com o surgimento e persistência de células auto-reativas no DM-1 e EM. Os dados indicam que essas alterações, principalmente a diminuição da expressão de moléculas pró-apoptóticas, como *bak* e *bax*, possam contribuir para a patogênese do DM-1 e EM. Além disso, a terapia de IAD/TACTH foi capaz de modular a expressão da maioria dos genes anormalmente expressos nas CMN dos pacientes com DM-1 e EM, já que esses atingiram níveis de expressão similares ao grupo controle após o transplante. Esta normalização da expressão de vários genes analisados correlacionou-se com a remissão clínica da doença na maioria dos pacientes

Palavras-chave: Doenças auto-imunes, *diabetes mellitus* tipo 1, esclerose múltipla, apoptose, Família Bcl-2, receptores de morte, Família das IAP, transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, G. L. V. **Evaluation of anti and proapoptotic gene and protein expression in type 1 *diabetes mellitus* and multiple sclerosis patients submitted to autologous hematopoietic stem cell transplantation**. 2008. 163f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) and multiple sclerosis (MS) are inflammatory, organ-specific autoimmune diseases characterized by selective destruction of insulin-producing pancreatic β-cells and central nervous system, respectively, by autoreactive B and T cells. Deregulation of apoptotic machinery is supposed to contribute to self-tolerance breakdown and pathogenesis of autoimmune diseases, once apoptotic molecules have an important role in the central and peripheral tolerance mechanisms. The aim of this study was to evaluate the expression of the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways molecules and the expression of the IAP Family molecules in 33 healthy controls, 15 T1DM and 18 MS patients submitted to high-dose immunossupression therapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (HDI/AHSCT). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from controls and patients at pre-mobilization (pre-mob), pre-conditioning, D+180, D+360, D+540 and D+720 post-transplantation. Isolated PBMC were used for RNA extraction, cDNA synthesis, relative expression quantification by Real Time RT-PCR of the *a1, bcl-2, bcl-w, bcl-x_L, bad, bak, bax, bid, bik, bim_{EL}, bok, noxa, fas, fasL, c-$FLIP_L$, cIAP-1* and *cIAP-2* genes, and quantification of Bcl-2, Bcl-x_L, Bak, Bim_{EL} and c-$FLIP_L$ proteins by western-blotting. Results are expressed as relative expression units as median in different analyzed samples. Results from T1DM patients indicated that antiapoptotic molecules *bcl-2* (median: 0,98; p=0,04), *bcl-w* (0,08; p=0,04), *mcl-1* (1254; p=0,03) and *cIAP-1* (1,24; p=0,003) were downregulated at pre-mob compared with healthy controls (medians *bcl-2*: 7,58; *bcl-w*: 0,52; *mcl-1*: 1659; *cIAP-1*: 14,5), while *cIAP-2* (60,8; p=0,0005) gene expression was upregulated compared to healthy controls (23,3). We observed a significant decrease expression of proapoptotic *bad* (0,002; p<0,0001), *bax* (0,01; p=0,002) and *fasL* (1,66; p=0,001) genes in patients' PBMC at pre-mob period compared to healthy controls (*bad*: 0,23; *bax*: 2,79; *fasL*: 3,56). mRNA levels of *bid* (0.10; p=0.001) and *bok* (0.72; p=0.006) were elevated at pre-mob period when compared to control group (*bid*: 0.004; *bok*: 0.31). *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-x_L*, *mcl-1*, *bad*, *bak*, *bax*, *bok*, *fasL* and *cIAP-1* mRNA levels reached controls levels after HDI/AHSCT. We observed that *bcl-w*, *cIAP-1* and *noxa* gene expression were increased in T1DM patients in remission when compared to relapsed patients. The decreased antiapoptotic gene expression and increased in proapoptotic molecules correlated with decreased glicosilated hemoglobin percentages (Hb A_{1C}) and anti-GAD65 antibodies and increased peptide-C levels. Results from MS patients showed decreased *bcl-w* (0,11; p=0,02) and *cIAP-1* gene expression (1,87; p=0,04) in patients' PBMC at pre-mob period compared to healthy controls (*bcl-w*: 0,27; *cIAP-1*: 7,75) and increased expression of *a1* (90,8; p=0,001) and *cIAP-2* (58,8; p=0,009) compared to controls (*a1*: 12,7; *cIAP-2*: 22,3). Proapoptotic molecules *bad* (0.007; p=0.01) and *bax* (0.0007; p=0.004) showed decreased gene expression at pre-mob compared to control group (*bad*: 0.27; *bax*: 1.24). *bid* (20.7; p=0.004), *bik* (0.84; p=0.01) and *bok* genes (1.77; p=0.0001) showed increased expression at pre-mob compared to healthy controls (*bid*: 2.64; *bik*: 0.33; *bok*: 0.26). Significant differences were not observed in the expression of the extrinsic pathway genes in pre-mob and healthy controls samples (p>0.05). *bcl-w*, *bak*, *bax*, *bik*, *bok* and *cIAP-1* expression values reached healthy control values after transplantation. We observed that *bcl-2*, *cIAP-1*, *bad* and *bax* gene expression was increased in MS patients in disease remission when compared to patients with neurologic progression. Significant correlation of increased proapoptotic genes expression with decreased EDSS values in MS patients after HDI/AHSCT was observed. Results of protein quantification of apoptotic molecules in PBMC of T1DM and MS patients were similar to the

gene expression results of these molecules, except for Bcl-2 and Bim proteins, which could have been targeted by post-transcriptional and post-translational changes. Taken together, these data indicate a deregulated expression of anti- and proapoptotic genes in T1DM and MS patients at pre-mob compared to healthy controls, suggesting an association of deregulated apoptosis with emergence and maintenance of autoreactive lymphocytes in these analyzed patients. Based on these results, we suggest that this altered gene expression profile, principally the decrease in the expression of proapoptotic genes, may contribute to T1DM and MS pathogenesis. Furthermore, we showed that the HDI/AHSCT therapy was able to modulate and normalize the expression of most genes abnormally expressed in T1DM and MS patients at pre-transplant period. Many analyzed genes achieved expression levels similar to healthy control group. The normalization of the expression of many evaluated genes significantly correlated to disease remission in the majority of the patients.

Keywors: Autoimmune diseases, type 1 *diabetes mellitus*, multiple sclerosis, apoptosis, Bcl-2 Family members, death receptors, IAP Family, autologous hematopoietic stem cell transplantation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Vias de sinalização intrínseca e extrínseca da apoptose celular 9

FIGURA 2. Esquema do procedimento da terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH utilizado na unidade de TMO do HCFMRP-USP 21

FIGURA 3. Curva de dissociação obtida para o gene *bcl-x*$_L$ com a formação de um único produto de PCR 30

FIGURA 4. Curvas de amplificação obtidas para o gene *bcl-x*$_L$ 31

FIGURA 5. Porcentagem de hemoglobina glicosilada A_{1C} nos pacientes com DM-1 nos períodos pré-TACTH, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-transplante. 37

FIGURAS 6 e 7. Níveis séricos de anticorpos anti-GAD65 e de peptídeo-C nos períodos pré-TACTH, D+180, D+360 e D+720 pós-TACTH 38

FIGURAS 8 a 12. Expressão relativa dos genes anti-apoptóticos da Família Bcl-2 nas células mononucleares de controles e pacientes com DM-1 nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 42

FIGURAS 13 a 20. Expressão relativa dos genes pró-apoptóticos da Família Bcl-2 nas células mononucleares de controles e pacientes com DM-1 nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 47

FIGURAS 21 a 23. Expressão relativa dos genes *c-FLIP*$_L$, *fas* e *fasL* nas células mononucleares de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1 nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 55

FIGURAS 24 e 25. Expressão relativa dos genes *cIAP-1* e *cIAP-2* nas células mononucleares de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1 nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 58

FIGURAS 26 a 30. Expressão relativa dos genes anti-apoptóticos da Família Bcl-2 nas células mononucleares de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 60

FIGURAS 31 a 38. Expressão relativa dos genes pró-apoptóticos da Família Bcl-2 nas células mononucleares de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 65

FIGURAS 39 a 41. Expressão relativa dos genes *cFLIP*$_L$, *fas* e *fasL* nas células mononucleares de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 73

FIGURAS 42 e 43. Expressão relativa dos genes *cIAP-1* e *cIAP-2* nas células mononucleares de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 76

FIGURAS 44 a 46. Expressão relativa dos genes *bcl-w*, *cIAP-1* e *noxa* nas células mononucleares dos pacientes em remissão e recaída do DM-1 nos períodos D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 79

FIGURAS 47 a 50. Correlação entre a expressão dos genes *bcl-w*, *bcl-2 e fas* e as porcentagens de hemoglobina glicosilada nos pacientes com DM-1 81

FIGURAS 51 e 52. Correlação entre a expressão dos genes *noxa* e *cIAP-1* e os níveis séricos de anticorpos anti-GAD65 nos pacientes com DM-1 83

FIGURAS 53 a 56. Correlação entre a expressão dos genes *fasL*, *bcl-w* e *a1* e os níveis séricos de peptídeo-C nos pacientes com DM-1 84

FIGURAS 57 a 60. Expressão relativa dos genes *bcl-2*, *cIAP-1*, *bad* e *bax* nas células mononucleares dos pacientes em remissão clínica e progressão neurológica da EM nos períodos D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 86

FIGURAS 61 a 66. Correlação entre a expressão dos genes *bid*, *bak*, *bax*, *bim*$_{EL}$ e *cIAP-1* e os valores de EDSS nos pacientes com EM 89

FIGURAS 67 a 71. Expressão protéica das moléculas Bcl-2, Bcl-x_L, Bak, Bim_{EL} e c-$FLIP_L$ nos pacientes com DM-1 93

FIGURAS 72 a 76. Expressão protéica das moléculas Bcl-2, Bcl-x_L, Bak, Bim_{EL} e c-$FLIP_L$ nos pacientes com EM 98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características demográficas e dados clínico-laboratoriais dos pacientes com DM-1 no período pré-TACTH 18

TABELA 2. Características demográficas e dados clínico-laboratoriais dos pacientes com EM do período pré-TACTH 19

TABELA 3. Características demográficas do grupo controle referente aos pacientes com DM-1 23

TABELA 4. Características demográficas do grupo controle referente aos pacientes com EM 24

TABELA 5. Seqüência dos *primers* desenhados para amplificação do cDNA dos genes da Família Bcl-2 nas reações de PCR em tempo real e tamanho dos produtos 28

TABELA 6. Seqüência dos *primers* desenhados para amplificação do cDNA dos genes da Família dos Receptores de Morte e da molécula anti-apoptótica c-FLIP$_L$ utilizados nas reações de PCR em tempo real e tamanho dos produtos 29

TABELA 7. Seqüência dos *primers* desenhados para amplificação do cDNA dos genes da Família das IAP, *β-actina* e *GAPDH* utilizados nas reações de PCR em tempo real e tamanho dos produtos 29

TABELA 8. Dados clínicos e avaliação clínica pós-TACTH dos pacientes com DM-1 36

TABELA 9. Dados clínicos e avaliação clínica pós-TACTH dos pacientes com EM 40

TABELA 10. Medianas das unidades relativas de expressão dos genes anti-apoptóticos da Família Bcl-2 nos controles e pacientes com DM-1 nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 46

TABELA 11. Medianas das unidades relativas de expressão dos genes pró-apoptóticos da Família Bcl-2 nos controles e pacientes com DM-1 nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 54

TABELA 12. Medianas das unidades relativas de expressão dos genes da via extrínseca da apoptose celular nos controles e pacientes com DM-1 nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 57

TABELA 13. Medianas das unidades relativas de expressão dos genes anti-apoptóticos da Família das IAP nos controles e pacientes com DM-1 nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 59

TABELA 14. Medianas das unidades relativas de expressão dos genes anti-apoptóticos da Família Bcl-2 nos controles e pacientes com EM nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 64

TABELA 15. Medianas das unidades relativas de expressão dos genes pró-apoptóticos da Família Bcl-2 nos controles e pacientes com EM nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 72

TABELA 16. Medianas das unidades relativas de expressão dos genes da via extrínseca da apoptose celular nos controles e pacientes com EM nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 75

TABELA 17. Medianas das unidades relativas de expressão dos genes anti-apoptóticos da Família das IAP nos controles e pacientes com EM nos períodos pré-mob, pré-cond, D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-TACTH 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1/BCL2A1 - do inglês "*BCL-2-related protein A1*"

AICD - do inglês "*activation-induced cell death*" ou morte celular induzida por ativação

APAF-1 - do inglês "*apoptotic-protease-activating factor 1*"

AR - artrite reumatóide

ATG - do inglês "*anti-thymocyte-globulin*" ou globulina anti-timocitária

Bad - do inglês "*BCL-2-antagonist of cell death*"

Bak - do inglês "*BCL-2-antagonist/killer*"

Bax - do inglês "*BCL-2-associated X protein*"

BCA - do inglês "bicinchoninic acid" ou ácido bicinconínico

Bcl-2 - do inglês "*B-cell lymphoma protein 2*"

BEAM - BiCNU®, etoposídeo, citarabina, melfalan

Bid - do inglês "*BH3-interacting-domain death agonist*"

Bik - do inglês "*BCL-2-interacting killer*"

Bim - do inglês "*BCL-2 interacting mediator of cell death*"

Bok - do inglês "*BCL-2-related ovarian killer protein*"

BSA - do inglês "Bovine serum albumin" ou albumina sérica bovina

CD - do inglês "*cluster of differentiation*", ou grupamento de diferenciação

c-FLIP$_L$ - do inglês "*cellular FLICE inhibitory protein*" isoforma longa

CTH - células-tronco hematopoéticas

CTLA-4 - do inglês "*citotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*"

Cu^{+1} - íon cupríco

Cu^{+2} - íon cuproso

DAI - Doença(s) auto-imune(s)

DEPC - dietilpirocarbonato

DIABLO - do inglês "*Direct IAP-binding protein with low pI*"

DISC - do inglês "*Death-inducing signaling complex*"

DM-1 - *diabetes mellitus* tipo 1

DR4 - do inglês "*Death receptor 4 (TRAIL receptor 1)*"

DR5 - do inglês "*Death receptor 5 (TRAIL receptor 2)*"

EAE - do inglês "*experimental autoimmune encephalomyelitis*", ou encefalomielite auto-imune experimental

EBV - vírus Epstein-Barr

EDSS - do inglês "*Expanded Disability Status Score*"

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - do inglês " Enzyme-linked immunosorbent assay"

EM - esclerose múltipla

FADD - do inglês "*Fas-associated via death domain*"

GA - do inglês "*Glatiramer acetate*"

GAD - do inglês " " ou ácido glutâmico descarboxilase

G-CSF - do inglês "*granulocyte-colony stimulating factor*" ou fator estimulador de colônias granulocíticas

GAPDH - do inglês "*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*"

Hb A_{1C} - Hemoglobina glicosilada $A1_C$

HLA - do inglês "*Human Leukocyte Antigens*" ou antígenos leucocitários humanos

Hsp60 - do inglês "*Heat shock protein 60*" ou proteína de choque térmico de 60 KDa

IAD - imunossupressão em altas doses

IAP - do inglês "*inhibitory apoptosis proteins*" ou proteínas inibidoras da apoptose

IDV - do inglês "*integrated density value"*

IFN-β - do inglês "*beta interferon*" ou interferon beta

IFN-γ - do inglês "*gamma interferon*" ou interferon gama

LES - lúpus eritematoso sistêmico

Mcl-1 - do inglês "*myeloid-cell leukaemia sequence 1*"

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

NOD - do inglês "*Non-obese diabetic mice*"

PBS - do inglês "*phosphate buffer saline*", ou tampão salina fosfato

Pré-cond: pré-condicionamento

Pré-mob: pré-mobilização

PCR - do inglês "*polymerase chain reaction*" ou reação em cadeia da polimerase

PVDF - do inglês "polyvinylidene difluoride"

RMN - ressonância magnética nuclear

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Smac - Second mitochondria-derived activator of caspase

TA - temperatura ambiente

TACTH - Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

TCR - inglês "*T cell receptor*", ou receptor de célula T

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TH - T "*helper*" ou células T auxiliares

TNF-α - do inglês "*tumor necrosis factor alpha*" ou fator de necrose tumoral alfa

TNFR1 - do inglês "*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A*"

URE - unidades relativas de expressão

VLA-4 - do inglês "*Very Late Antigen-4*"

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
μ	Micro
η	Nano
Δ	Delta
®	Marca registrada
™	Trademark

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS AUTO-IMUNES

As doenças auto-imunes (DAI) constituem um grupo complexo e heterogêneo de doenças que atingem cerca de 5 a 8% da população mundial (BAECHLER et al., 2006). Estas doenças são caracterizadas por anormalidades nos processos de regulação da tolerância imunológica a antígenos próprios e resultam da destruição tecidual por linfócitos T auto-reativos e auto-anticorpos (DAVIDSON e DIAMOND, 2001; MARRACK et al., 2001; SELMI, 2007; MACKAY et al., 2008).

A tolerância imunológica pode ser definida como a não-responsividade aos auto-antígenos devido à exposição prévia a este antígeno. Indivíduos normais são, portanto, tolerantes aos antígenos próprios devido aos processos de tolerância central e periférica atuantes no sistema imune (OHASHI, 2003; RIOUX e ABBAS, 2005). A tolerância central é induzida em linfócitos imaturos pelo reconhecimento dos auto-antígenos nos órgãos linfóides primários e a periférica é gerada pela inativação de resposta dos linfócitos já maduros circulantes na periferia (KAMRADT e MITCHISON, 2001; GOODNOW et al., 2005)

As células B diferenciam-se na medula óssea e os mecanismos de tolerância central para estas células compreendem a deleção clonal de células B auto-reativas e edição de receptores, mecanismo que altera a especificidade do receptor da célula B quando um auto-antígeno é reconhecido (KAMRADT e MITCHISON, 2001; RIOUX e ABBAS, 2005). Os linfócitos T sofrem maturação no timo por meio da seleção negativa, que promove a apoptose em células que reconhecem antígenos com alta avidez no timo (GOODNOW et al., 2005; KRONENBERG e RUDENSKY, 2005).

No entanto, alguns linfócitos auto-reativos maduros escapam da tolerância central e caem na circulação, onde serão controlados pelos mecanismos de tolerância periférica. Na periferia, os linfócitos auto-reativos podem ser silenciados pela inativação funcional ou anergia, deleção por apoptose induzida por ativação (AICD- *activation-induced cell death*), inibição da resposta dos linfócitos T por moléculas co-estimulatórias como a CTLA-4 e supressão da resposta imune pelas células T regulatórias (Tregs) (KAMRADT e MITCHISON, 2001; BURT et al., 2002; BONNOTTE, 2004; GOODNOW et al., 2005; SAKAGUCHI, 2005).

As causas da quebra da tolerância imunológica aos auto-antígenos são desconhecidas, mas acretita-se que envolvam, dentre outras, alterações na expressão de genes da via intrínseca da maquinaria apoptótica, visto que esses estão envolvidos nos processos de deleção de células durante a tolerância central. Além disso, defeitos no processo de AICD, que está relacionado aos processos de deleção celular durante a tolerância periférica e que envolve a expressão de genes da via extrínseca da apoptose

celular podem também participar desse processo (KÜHTREIBER et al., 2003; TODARO et al., 2004; GRONSKI e WEINEM, 2006; SOHN et al., 2007).

As DAI podem ser classificadas em órgão-específicas ou sistêmicas e acometem principalmente as mulheres (BROADLEY et al., 2000; GLEICHER e BARAH, 2007; ZANDMAN-GODDARD et al., 2007). As doenças órgão-específicas são caracterizadas por lesões imuno-mediadas em um órgão ou tecido específico. Exemplos destes são as células β pancreáticas em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e as células produtoras de mielina e revestidas por esta no sistema nervoso central em pacientes com esclerose múltipla. Em DAI sistêmicas observam-se reações imunes contra diversos órgãos e tecidos, o que promove o aparecimento de lesões generalizadas e formação de imuno-complexos, como no lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (MAAS et al., 2002; BONNOTTE, 2004).

A maioria das DAI são multigênicas e várias delas estão associadas a um ou mais alelos de HLA de classe I ou II específicos. Dentre estes alelos, alguns podem conferir suscetibilidade, enquanto outros proteção à doença. Além da importância dos fatores genéticos, as baixas taxas de concordância entre gêmeos idênticos sugerem uma contribuição fundamental de fatores ambientais e eventos estocásticos para o desenvolvimento da auto-imunidade (ERMANN e FATHMAN, 2001; MARRACK et al., 2001).

O tratamento das DAI é convencionalmente realizado por meio de drogas imunossupressoras, cujo objetivo principal é bloquear e/ou inibir inespecificamente a ativação dos linfócitos B e T, incluindo os linfócitos auto-reativos. Nos últimos anos, uma alternativa terapêutica inovadora e promissora é a indução de tolerância pela imunossupressão em altas doses seguida pelo transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (BURT et al., 2002; FARIAS, 2006; VOLTARELLI et al., 2007; BURT et al., 2008).

O presente projeto estudará dentre as DAI, o *diabetes mellitus* tipo 1 e a esclerose múltipla e, portanto somente essas duas serão detalhadas nessa introdução.

1.2. *DIABETES MELLITUS* TIPO 1

O *diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) é uma DAI caracterizada pela destruição seletiva das células β pancreáticas, produtoras de insulina, das ilhotas de Langerhans no pâncreas (NARENDRAN et al., 2005; KNIP e SILJANDER, 2008). A doença apresenta duas fases distintas: a insulite, ocasionada pela infiltração das ilhotas pancreáticas por linfócitos T auto-reativos e auto-anticorpos, e o diabetes propriamente dito, fase na qual 80-90% das células β pancreáticas foram destruídas e já não produzem insulina suficiente para regular os níveis de glicose no sangue, resultando na hiperglicemia e posteriormente em complicações vasculares graves (GILLESPIE, 2006; EISENBARTH, 2007; KNIP e SILJANDER, 2008).

A taxa de incidência do DM-1 varia de 0,3-0,4% da população mundial de acordo com a área geográfica e com os grupos étnicos estudados, sugerindo diferenças na suscetibilidade genética, bem como o papel de fatores ambientais. Atinge principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens de origem caucasiana, com pico de incidência entre cinco e 15 anos de idade, embora possa aparecer em indivíduos em qualquer faixa etária (VOLTARELLI, 2004; GILLESPIE, 2006).

O DM-1 apresenta padrão de herança multigênico e é influenciado por fatores genéticos e ambientais. Em relação aos fatores genéticos, vários alelos na região do HLA de classe II estão envolvidos na predisposição ao DM-1, alguns deles associados à suscetibilidade e à proteção ou resistência à doença. Dentre os indivíduos caucasianos com DM-1, 90-95% apresentam positividade para os alelos HLA-DR3 e HLA-DR4. Por outro lado, indivíduos com HLA-DQβ1 0602 raramente desenvolvem o diabetes tipo 1 (NARENDRAN et al., 2005; GILLESPIE, 2006; EISENBARTH, 2007).

Embora a predisposição genética seja necessária, não é suficiente para o desenvolvimento clínico da doença. A discordância entre gêmeos idênticos reflete na geração de diferentes repertórios de células imunes por meio dos rearranjos randômicos dos genes que codificam os receptores das células B e T, indicando a relevância dos fatores não-genéticos ou ambientais no desenvolvimento do DM-1 (NARENDRAN et al., 2005). Os fatores ambientais podem acelerar ou retardar a manifestação da doença e incluem infecções virais tais como a rubéola, enteroviroses, rotavírus e citomegalovírus. Pelo menos 40% das crianças cujas mães adquiriram a rubéola durante a gestação possuem anticorpos contra as células β pancreáticas, e aproximadamente metade dessas crianças desenvolvem o DM-1 (FARIAS, 2006; GILLESPIE, 2006).

Diversos mecanismos podem contribuir para a destruição das células β pancreáticas, dentre eles estão: reações imunes mediadas por células T $CD4^+$ de padrão T_H1, ação de linfócitos T citotóxicos, auto-anticorpos e também reações mediadas pela produção local de IL-1 e TNF-α. Estas citocinas produzidas pelos macrófagos, que estão presentes na reação inflamatória gerada no pâncreas, inibem a secreção de insulina, potencializando a hiperglicemia gerada pela destruição das células β pancreáticas (COOKE et al, 2001; NARENDRAN et al., 2005).

Nos pacientes com DM-1, as respostas dos linfócitos T e dos auto-anticorpos são direcionadas a antígenos próprios presentes nas células β pancreáticas nas ilhotas. Estes auto-antígenos incluem peptídeos derivados da insulina, isoforma de 65 kDa do ácido glutâmico descarboxilase (GAD65), proteína tirosina fosfatase (IA-2) e proteína hsp60 (*Heat shock protein 60*) (MATHIS et al., 2001; KIM et al., 2004; ZANIN-ZHOROV et al, 2006).

Os indivíduos portadores de DM-1 possuem número reduzido de células Tregs circulantes (CHEN et al, 2005). Estas células possuem a capacidade de suprimir a ação de células T efetoras, e, portanto, o fato dos pacientes com DM-1 apresentarem uma contagem menor de Tregs indica que qualquer desregulação da função destas células irá contribuir para a patogênese do DM-1 (LINDLEY, et al. 2005).

Novas abordagens terapêuticas, com o intuito de corrigir o distúrbio imunológico do paciente com DM-1 incluem: transplante de pâncreas ou de ilhotas pancreáticas, indução de tolerância com insulina oral, com fragmentos de insulina associados ou não a moléculas de HLA, anticorpo monoclonal humanizado anti-CD3, que tem efeito imunossupressor e gera populações de células com propriedades imuno-regulatórias e administração de peptídeos derivados da proteína Hsp60, que visam aumentar a capacidade das Tregs de inibir a secreção de IFN-γ e TNF-α (MASTELLER e BLUESTONE, 2002; VOLTARELLI, 2004; NARENDRAN et al., 2005; THOMAS et al., 2005; GILLESPIE, 2006; ZANIN-ZHOROV et al., 2006; PRUD'HOMME et al., 2007).

O transplante de medula óssea alogênico, tanto em camundongos NOD (*Non-obese diabetic mice*), como em pacientes com diabetes, mostrou-se capaz de curar ou de transmitir a doença, dependendo do estado do doador, se sadio ou diabético, respectivamente (DOMENICK e ILDSTAD, 2001). Por outro lado, a terapia de imunossupressão em altas doses, associada à infusão de células-tronco hematopoéticas autólogas, têm o potencial de impedir a destruição total das células β pancreáticas produtoras de insulina e induzir remissões clínicas significativas e prolongadas nos pacientes (VOLTARELLI, 2004; VOLTARELLI et al., 2007; COURI e VOLTARELLI, 2008).

1.3. ESCLEROSE MÚLTIPLA

A esclerose múltipla (EM) é uma DAI crônica e inflamatória mediada por células B e T auto-reativas (ACHIRON et al., 2004; HONG et al., 2004; TRAPP e NAVE, 2008). As lesões inflamatórias presentes nessa doença estão associadas à formação de placas escleróticas e destruição da bainha de mielina dos neurônios no sistema nervoso central. Os sintomas são diversos, incluindo fraqueza motora, visão reduzida e falta de coordenação motora, podendo causar invalidez e por sua vez um grande impacto sócio-econômico (BOMPREZZI et al., 2003; LUTTON et al., 2004).

A prevalência da EM é variável, e estima-se que aproximadamente uma em 1.000 pessoas de origem norte européia tenha probabilidade de desenvolver a doença. As mulheres são significativamente mais suscetíveis que os homens, na proporção de 2:1. A EM atinge preferencialmente adultos jovens com menos de 40 anos, sendo o pico de incidência aos 25 anos (BOMPREZZI et al., 2003; LUTTON et al., 2004).

Evidências para a forte contribuição genética no desenvolvimento da EM advém de estudos em famílias com gêmeos, os quais relataram que o risco de desenvolver a doença aumenta com o grau de compartilhamento da informação genética. Algumas das associações genéticas mais fortes com a EM são dos alelos HLA de classe II, em particular HLA-DR15Dw2 e DQw6 (LAAKSONEN et al., 2002, LUTTON et al., 2004). Recentemente, o estudo de Hafler e colaboradores (2007) identificou que certos alelos dos genes que codificam a cadeia α das interleucinas 2 e 7 (IL-2 e IL-7) podem estar associados ao desenvolvimento da EM.

Outros fatores que aumentam a susceptibilidade à EM são os ambientais, tais como infecções virais, mais especificamente pelo vírus Epstein-Barr (EBV), que mostrou ter grande influência no desenvolvimento da doença, uma vez que estudos demonstraram que 99% dos pacientes com EM são soropositivos para o EBV (ASCHERIO e MUNCH, 2000; PENDER e GREER, 2007).

As lesões encontradas na EM no sistema nervoso central são mediadas por células do sistema imune, já que foi observado que os infiltrados inflamatórios são constituídos de células B e T, macrófagos e micróglia ativada. Recentemente, foram descobertas estruturas similares aos folículos linfóides de células B com centros germinais nas meninges de pacientes com EM secundária progressiva. Estes folículos ectópicos contêm células B em proliferação, plasmócitos, células T e células dendríticas. Portanto, estes centros germinais presentes nas meninges, possivelmente são sítios de produção, ativação e proliferação de células B e T reativas a auto-antígenos do sistema nervoso central (SERAFINI et al., 2004; PENDER e GREER, 2007).

Há relatos também de que as células T $CD4^+$ T_H1 secretoras de IFN-γ sejam importantes na patogênese da EM. Essas células estão presentes no sangue e no líquor dos pacientes com EM, enquanto que os macrófagos ativados estão nas placas escleróticas. Esses macrófagos liberam proteases e citocinas, causando a desmielinização direta (LUTTON et al., 2004).

Apesar de todas essas observações, têm surgido trabalhos indicando o papel das células T $CD4^+$ T_H17 em patologias auto-imunes (KIKLY, et al., 2006; BETTELLI et al, 2007). Várias condições auto-imunes, previamente assumidas como desordens mediadas por linfócitos T de padrão T_H1, agora parecem envolver células de padrão T_H17. Estudos mostram que células T_H17 murinas participam da patogênese da EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) (KIKLY et al, 2006; COOKE, 2006; BETTELLI et al, 2007).

Algumas abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento da EM, com o intuito de prevenir a destruição da proteína básica da mielina, promover a remielinização e restaurar a tolerância imunológica são: tratamento com corticosteróides, que inibem a resposta imune de padrão T_H1 e diminui a migração de células T através da barreira hemato-encefálica;

terapias baseadas no uso do IFN-β que tem propriedades imunomodulatórias, reduzindo o acesso das células T ao sistema nervoso central, o que diminui a apresentação dos auto-antígenos a célula T e aumenta a expressão de citocinas anti-inflamatórias como TGF-β e IL-10; terapia com GA (*glatiramer acetate*); bloqueio da migração linfocitária pela administração de anticorpo monoclonal anti-VLA-4, que diminui as recaídas em 50%; reparo da mielina pelo transplante de células mielinizantes exógenas e transplante de células-tronco ou precursores neuronais multipotentes, que migram para os sítios de desmielinização e diferenciam-se em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, promovendo a regeneração (HOHLFELD e WEKERLE, 2004; VIRLEY, 2005).

O tratamento utilizado nos últimos anos envolve a utilização de imunossupressores e imunomoduladores (IFN-β). Uma nova estratégia terapêutica está sendo utilizada em alguns centros de referência em medicina que é a imunossupressão em altas doses seguida pelo transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH), que tem mostrado resultados positivos no tratamento da EM grave e refratária aos tratamentos convencionais. O intuito do TACTH é eliminar células auto-reativas pela imunoablação e reconstituir o sistema imune pela infusão de células-tronco hematopoéticas, restabelecendo a tolerância imunológica (BURT et al., 2002; LUTTON et al., 2004; SUN et al., 2004; BURT et al., 2005; MURARO et al., 2005; VIRLEY, 2005, BURT et al., 2008).

1.4. APOPTOSE E DOENÇAS AUTO-IMUNES

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostasia do sistema imune. É um processo vital e importante durante o desenvolvimento normal de células do sistema imune e participa ativamente dos processos de tolerância central e periférica (SIEGEL e FLEISHER, 1999; OPFERMAN e KORSMEYER, 2003). Alterações na função ou expressão de moléculas da maquinaria apoptótica podem resultar em condições patológicas que têm sido associadas ao desenvolvimento da autoimunidade, câncer, imunodeficiências e doenças neurodegenerativas (SOLARY et al., 1996; AFFORD e RANDHAWA, 2000; KAWAKAMI e EGUCHI, 2002; RIOUX e ABBAS, 2005; OPFERMAN, 2008).

Especificamente nas DAI, as alterações nos mecanismos de apoptose podem contribuir para o seu desencadeamento e perpetuação. É provável que alterações na expressão de genes da maquinaria apoptótica durante os mecanismos de seleção negativa de linfócitos auto-reativos possam estar envolvidas no desenvolvimento de DAI. Além disso, alteração dos processos apoptóticos podem potencializar os mecanismos de auto-destruição celular na fase efetora da doença, resultando em danos aos tecidos-alvo (VAUX e FLAVELL, 2000; OPFERMAN e KORSMEYER, 2003; RIOUX e ABBAS, 2005).

A apoptose pode ser iniciada pelas vias intrínseca ou mitocondrial e extrínseca ou via receptores de morte. Quando esses processos são desencadeados um conjunto de proteases, as caspases, são ativadas para executar o programa final de morte celular programada, clivando substratos específicos, normalmente envolvidos na estrutura e integridade celulares (BRÖKER et al., 2005; GUSTAFSSON e GOTTLIEB, 2007; OPFERMAN, 2008).

A via intrínseca (mitocondrial) é desencadeada pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular, tais como irradiação, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento, os quais convergem para a mitocôndria. A ativação desta via depende da liberação de certos fatores mitocondriais para o citosol, tais como o citocromo *c* e Smac/DIABLO, que juntamente com a molécula APAF-1 (*apoptotic-protease-activating factor 1*) e pró-caspase-9 formam o apoptossomo, que desencadeia a cascata de ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7, que conduzem por sua vez, aos processos terminais de apoptose (LI et al., 1997; EARNSHAW et al., 1999; OPFERMAN, 2008). A liberação de Smac/DIABLO pela mitocôndria auxilia na supressão de inibidores das caspases, como as IAP ou proteínas inibidoras da apoptose (cIAP-1, cIAP-2, Survivina, XIAP), que previnem a ativação das caspases bloqueado a sua clivagem (OPFERMAN e KORSMEYER, 2003; REED et al., 2003; GUSTAFSSON e GOTTLIEB, 2007).

Algumas moléculas que atuam na mitocôndria são centrais no controle da apoptose pela via intrínseca, como as proteínas da Família Bcl-2. Essa família de proteínas está dividida em três grupos: membros que inibem a apoptose ou anti-apoptóticos (A1/Bfl-1, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w e Mcl-1), que possuem quatro regiões de homologia (domínios BH1-4); membros que sensibilizam a célula a morte celular ou pró-apoptóticos (Bad, Bax, Bid, Bim_{EL}, Bik, Noxa e Puma), que apresentam o domínio BH3 e proteínas multidomínio, denominadas BAX-like (Bak, Bax e Bok), que também têm ação pró-apoptótica e contém os domínios BH1-3 (CHAO e KORSMEYER, 1998; NEWTON e STRASSER, 1998; MÜLLAUER et al., 2001; BORNER, 2003).

As proteínas pró-apoptóticas com domínio BH3 parecem ser as principais no controle dos processos apoptóticos, e são dinamicamente reguladas por vários mecanismos incluindo controle transcricional e pós-traducional (WILLIS et al., 2005). As moléculas pró-apoptóticas Bak e Bax constituem requisito importante no desencadeamento da morte pela via de sinalização mitocondrial da apoptose, pois após ativadas, estas duas oligomerizm-se na mitocôndria, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial externa e liberação do citocromo *c*. As proteínas com domínio BH3 necessitam de Bak e Bax para mediar os processos de apoptose e controlar os sinais de morte e sobrevivência celular pela via intrínseca.

Os membros anti-apoptóticos da Família Bcl-2 agem pelo seqüestro de moléculas com domínio BH3, formando complexos estáveis e prevenindo a ativação de Bak e/ou Bax ou pela antagonização direta de Bak e Bax (CHENG et al., 2001; ZONG et al., 2001; WILLIS et al., 2007; OPFERMAN, 2008).

A via extrínseca é ativada pela interação de receptores localizados na superfície celular, denominados receptores de morte, aos seus ligantes específicos. Esses receptores incluem o Fas (CD95), TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6. Esta via inicia-se pela trimerização dos DR, que no caso da interação Fas-FasL, permite o recrutamento de duas proteínas sinalizadoras, FADD (*Fas-associated death domain*) e pró-caspase-8, formando o complexo DISC (*Death-inducing signaling complex*). A pró-caspase-8 ativada pelo DISC é liberada para o citoplasma, no qual poderá agir na fase efetora do processo ao ativar diretamente a caspase-3, ou então promover o desencadeamento da via intrínseca por meio da clivagem da molécula Bid, a qual se dirige à mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo *c* e Smac (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999; OPFERMAN e KORSMEYER, 2003).

Nos linfócitos, ou células do tipo I, a apoptose mediada por receptores de morte mostra-se independente das proteínas da Família Bcl-2, pois a ativação da caspase-8 é suficiente para catalizar e dar seqüência a cascata de ativação das caspases. No entanto, em outras células, tais como hepatócitos (tipo II), a sinalização por receptores de morte está conectada a proteínas da Família Bcl-2 pela ativação, mediada pela caspase-8, da molécula pró-apoptótica Bid (STRASSER et al., 1995; YIN et al., 1999; OPFERMAN, 2008).

O recrutamento e ativação da pró-caspase-8 são reguladas pela proteína anti-apoptótica c-FLIP (*cellular FLICE inhibitory protein*). Esta molécula pode se ligar ao complexo Fas-FADD, inibindo a clivagem e ativação da pró-caspase-8 em caspase-8 ativa, impedindo o desencadeamento do processo apoptótico (GUSTAFSSON e GOTTLIEB, 2007).

As vias intrínseca e extrínseca da apoptose celular estão exemplificadas na figura 1.

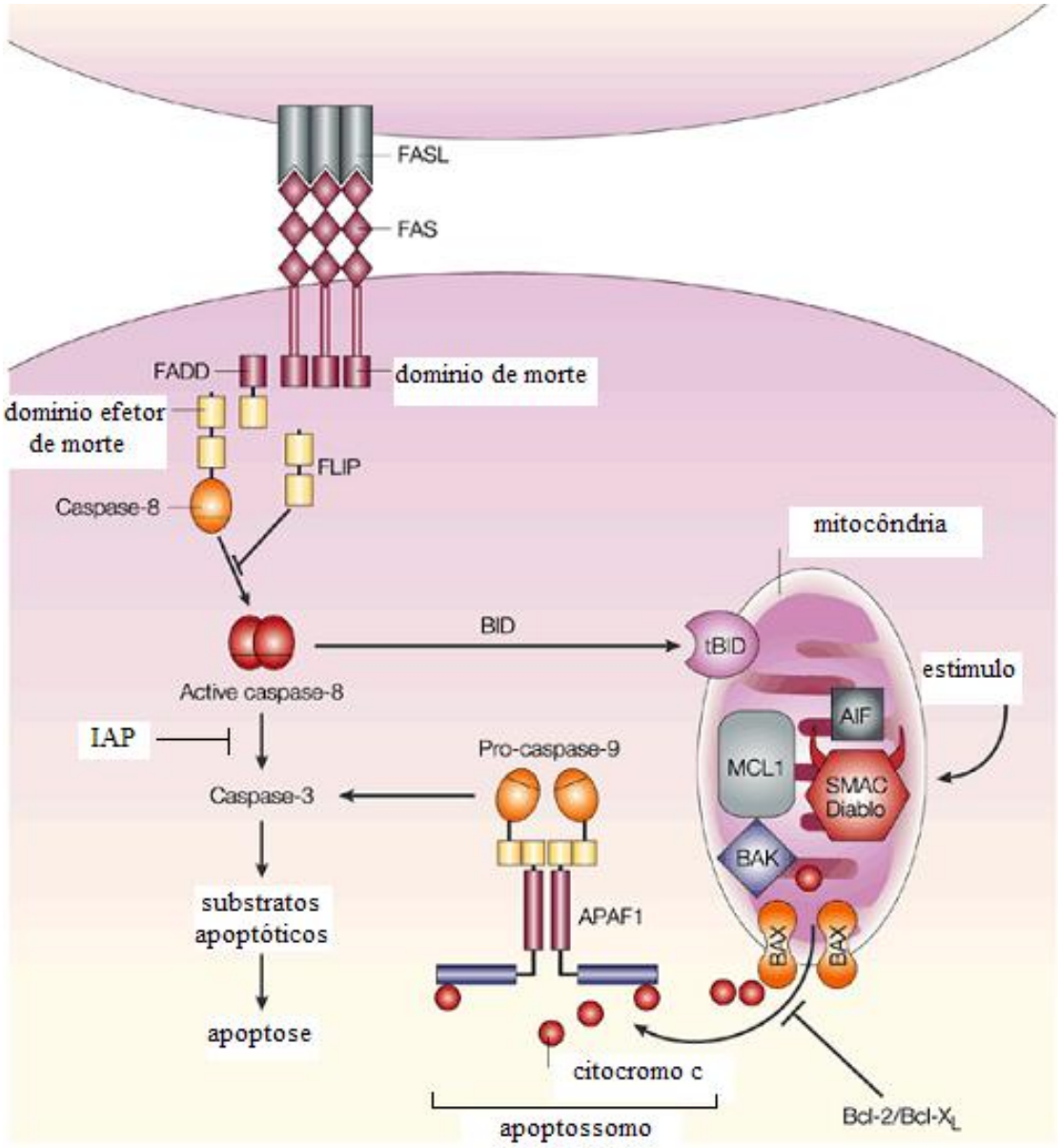

Figura 1: Esquema das vias de sinalização intrínseca e extrínseca da apoptose celular (adaptado de POPE, 2002).

A diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas e aumento de anti-apoptóticas estão associadas ao aparecimento de DAI, doenças hematológicas e resistência a drogas. Alterações na suscetibilidade e/ou resistência dos linfócitos à apoptose *in vitro* têm sido relatadas em muitas DAI, tais como o DM-1 (HAYASHI e FAUSTMAN, 2001; GRONSKI e WEINEM, 2006), EM (ZIPP, 2000; SHARIEF et al., 2002; SHARIEF et al., 2003), artrite reumatóide (AR) (POPE, 2002; LIU e POPE, 2003; LIU et al., 2006), lúpus eritematoso sistêmico (LES) (MUNOZ et al., 2008) e doenças inflamatórias do intestino (SHARMA et al., 2000).

As conseqüências da manipulação da apoptose podem ser benéficas ou deletérias, assim seria benéfica no tratamento de neoplasias, no tratamento de doenças neurodegenerativas, na regulação de processos inflamatórios, no tratamento de rejeição em

transplantes, na regulação da regeneração e reparo de tecidos e no restabelecimento e promoção da tolerância imunológica (AFFORD e RANDHAWA, 2000; RIOUX e ABBAS, 2005).

Um exemplo interessante da participação das moléculas pró-apoptóticas no sistema imune seria o papel desempenhado pelo sistema Fas/FasL, que não está envolvido diretamente no processo de seleção tímica, mas participa do processo de deleção clonal de linfócitos auto-reativos na periferia através da AICD (DE MARIA et al., 1998). O receptor Fas está expresso em uma ampla variedade de células e tecidos normais e malignos, incluindo linfócitos B e T ativados e linhagens linfóides malignas, enquanto que o Fas ligante está predominantemente em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ ativadas e células NK (RIETZ et al., 2003).

Nesse contexto, vale ressaltar que o processo de apoptose é um importante mecanismo na prevenção da auto-imunidade, pois participa ativamente dos processos de tolerância central e periférica, eliminando linfócitos auto-reativos potencialmente patogênicos (SOLARY et al., 1996; SHARIEF et al., 2002).

1.4.1. *DIABETES MELLITUS* TIPO 1 E APOPTOSE

Estudos em modelos animais têm contribuído com novas informações sobre a relação entre a alteração da apoptose e a patogênese do DM-1. Há relatos na literatura da associação entre o *locus* Bcl-2 e DM-1 em camundongos NOD (SOLARY et al., 1996; RIETZ et al., 2003). Estes camundongos desenvolvem diabetes espontaneamente com características muito similares ao DM-1 humano e apresentam elevado número de linfócitos T circulantes resistentes a vários sinais apoptogênicos (DECALLONE et al., 2003). As alterações presentes nesses linfócitos possivelmente são mediadas por expressão defeituosa de genes e proteínas reguladoras da apoptose celular, o que resulta na sobrevivência prolongada dos linfócitos T *in vitro* e *in vivo* nos camundongos NOD (RIETZ et al., 2003).

Outras evidências da desregulação do processo de apoptose celular em DM-1 foram relatadas em investigações de que linfócitos ativados em camundongos NOD, quando privados de IL-2, tornam-se mais resistentes à apoptose do que os linfócitos de camundongos de linhagens não auto-imunes. Outros estudos com linfócitos de camundongos NOD mostraram que células T esplênicas ativadas, privadas de IL-2, possuem expressão aumentada de Bcl-x_L, membro anti-apoptótico da Família Bcl-2 (RIETZ et al., 2003).

Em pacientes com DAI foi mostrado que outros membros da Família Bcl-2 estão alterados, como o Bim e o Bcl-2 (HUGHES et al, 2006). De fato, a expressão constitutiva do gene *bcl-2* e diminuição da ativação do *bim* promovem aumento de sobrevida das células B em todos os estágios de desenvolvimento e de linfócitos T auto-reativos, amplificando e prolongando as respostas auto-imunes (RIETZ et al., 2003; HUGHES et al, 2006).

A molécula Fas também desempenha papel importante na destruição das células β, pois o Fas é expresso constitutivamente nas células β de camundongos NOD. Este receptor de morte também está expresso nas células β pancreáticas em indivíduos com diagnóstico recente de DM-1 e seus níveis estão aumentados no soro desses pacientes (DEFRANCO et al., 2001; SILVA et al., 2003; PROTOPSALTIS et al., 2007).

Até o momento existem poucos trabalhos descritos na literatura que analisaram o papel da apoptose celular na patogênese do DM-1. Portanto, esse presente trabalho irá contribuir nesse sentido, por meio da análise da expressão de genes anti- e pró-apoptóticos em pacientes com DM-1 antes e após o TACTH.

1.4.2. ESCLEROSE MÚLTIPLA E APOPTOSE

Existem alguns trabalhos publicados que associam a desregulação da expressão de genes da maquinaria apoptótica com a manutenção de células auto-reativas resistentes à apoptose e a fisiopatologia da EM (SEMRA et al., 2001; SHARIEF e SEMRA, 2001; SHARIEF et al., 2002; SEIDI e SHARIEF, 2002; GOMES et al., 2003; SHARIEF et al., 2003; HEBB et al., 2008).

Linfócitos T de pacientes com EM estimulados *in vitro* mostraram aumento da expressão de genes anti-apoptóticos da Família Bcl-2, como o *bcl-x_L*, e maior resistência à morte celular induzida por ativação (WAICZIES et al., 2002).

Sharief e colaboradores (2002) observaram a redução significativa da expressão dos genes pró-apoptóticos em relação aos anti-apoptóticos nos pacientes com EM, quando comparados ao grupo controle. Este desequilíbrio nas taxas de expressão das proteínas pró e anti-apoptóticas está correlacionado à redução da suscetibilidade celular à apoptose em pacientes com EM.

Padrões anormais de expressão das proteínas da Família Bcl-2 na EM podem promover a resistência de linfócitos T auto-reativos a apoptose. Estes linfócitos potencialmente patogênicos perpetuam-se na periferia, cruzam a barreira hemato-encefálica e vão ocasionar destruição tecidual no sistema nervoso central. Portanto, a etiologia da EM envolve, de fato, defeitos nos mecanismos de deleção de células auto-reativas por apoptose (SHARIEF et al., 2002).

Nesse mesmo contexto, mais um trabalho do mesmo grupo sugere que a proteína Bcl-2 encontra-se aumentada nos linfócitos presentes nas placas escleróticas do sistema nervoso e no sangue periférico de pacientes com EM. O aumento da expressão dos genes *bcl-x_L* e *bcl-2* parece participar do desenvolvimento ou agravamento da EM nesses pacientes (SHARIEF et al., 2003).

Vários pesquisadores relataram ainda que as células T auto-reativas de pacientes com EM são mais resistentes a apoptose do que as células de indivíduos saudáveis. Esta

diminuição da suscetibilidade a morte celular adquirida pelos linfócitos T auto-reativos deve-se provavelmente a alterações nas vias apoptóticas que envolvem os receptores de morte Fas e FasL e proteínas da Família Bcl-2 (SEIDI e SHARIEF, 2002; SATOH et al., 2005). A expressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, c-FLIP e da Família das IAP estão significativamente aumentadas nos linfócitos T ativados dos pacientes com EM quando comparada aos indivíduos saudáveis (SHARIEF e SEMRA, 2001; SHARIEF et al., 2002).

A participação de células B na patogênese da EM também é fundamental, uma vez que essas células produzem altos níveis de auto-anticorpos contra a proteína básica da mielina. Os linfócitos B auto-reativos dos pacientes com EM apresentam, igualmente aos linfócitos T, uma sobrevida aumentada, provavelmente relacionada aos altos níveis de expressão dos genes *bcl-2* e *c-FLIP* nessas células. A maior sobrevida de células B permite a produção contínua e prolongada de auto-anticorpos, que conseqüentemente participam na destruição tecidual (SEMRA et al., 2001; SEIDI e SHARIEF, 2002; GOMES et al., 2003; SHARIEF et al., 2003).

Em camundongos com EAE, que constitui o modelo animal para estudos com EM, o aumento da resistência de linfócitos à morte celular e a desregulação da expressão de moléculas da maquinaria apoptótica também foram detectados (OKUDA et al., 2002; LEV et al., 2004).

Nesse projeto avaliaremos a expressão dos genes e proteínas reguladores do processo de apoptose em pacientes com EM antes e após a terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH, e correlacionaremos os resultados obtidos com os dados já descritos na literatura e aspectos clínico-laboratoriais dos pacientes.

1.5. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS EM DOENÇAS AUTO-IMUNES

A maioria dos pacientes com DAI respondem aos tratamentos convencionais, como drogas imunossupressoras, quimioterápicos e imunoterapias, tendo uma boa expectativa de vida. No entanto, alguns pacientes são acometidos por formas de auto-imunidade graves e progressivas, resistentes a estas terapias convencionais. O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) têm sido ultimamente uma alternativa terapêutica para esses pacientes com DAI agressiva e refratária aos tratamentos convencionais (FARIAS, 2006; BOHGAKI et al., 2008).

O TCTH envolve a administração de células-tronco hematopoéticas que possuem a capacidade de auto-renovação e de originar todos os tipos celulares maduros do sistema hematopoético e imunológico. O receptor é preparado para o transplante por um tratamento prévio com um imunossupressor potente seguido pela infusão de células-tronco

hematopoéticas autólogas ou alogênicas, coletadas de um doador compatível, para a reconstituição dos sistemas hematopoético e imunológico do receptor, evitando citopenias prolongadas (SYKES e NIKOLIC, 2005; BURT et al., 2008).

Nos últimos anos, ensaios clínicos têm demonstrado que a imunossupressão em altas doses seguida do TACTH é capaz de suprimir a atividade inflamatória em pacientes com DAI e pode induzir remissões clínicas prolongadas, mas o mecanismo de ação do transplante ainda não está bem esclarecido. A idéia do TACTH é que a imunossupressão intensa possa eliminar os linfócitos auto-reativos e que o sistema imune então reconstituído possa restabelecer a tolerância imunológica (FARIAS, 2006, BURT et al., 2008; BOHGAKI et al., 2008).

Algumas hipóteses foram formuladas para tentar explicar o mecanismo de ação do TACTH em DAI: 1) a imunoablação intensa elimina a resposta imunológica patogênica; 2) o TACTH reconstitui um novo sistema imune autotolerante; 3) as células-tronco hematopoéticas promovem reparo tecidual (BURT et al., 2002; MURARO e MARTIN, 2003). Apesar do rápido acúmulo de experiência clínica durante os últimos dez anos, dados sobre o mecanismo de ação do TACTH em DAI humanas eram muito escassos até o ano de 2004, quando os primeiros estudos mais elaborados de reconstituição imunológica começaram a aparecer na literatura (SUN et al., 2004; MURARO et al., 2005; FARGE et al., 2005; KÖTTER et al., 2005; DE KLEER et al., 2006). Atualmente, o mecanismo mais aceito é a reprogramação do sistema imunológico após o TACTH, constituindo uma junção das duas primeiras hipóteses citadas anteriormente (BURT et al., 2002; MURARO e MARTIN, 2003). Conforme esse mecanismo, a imunossupressão em altas doses eliminaria os linfócitos B e T auto-reativos de memória e em seguida, baseando-se na premissa de que fatores ambientais têm papel no desencadeamento das DAI, seria possível que a eliminação do repertório de células B e T pré-existente permita que o sistema imunológico do paciente reinicie do zero, gerando novos linfócitos B e T que sejam autotolerantes após o transplante (SYKES e NIKOLIC, 2005; BURT et al., 2008).

No entanto, não está claro se as células B e T de memória são completamente removidas do sistema hematopoético, linfóide e de órgãos alvos, por qualquer que seja o regime de condicionamento. Assim, a imunoablação incompleta pode ser responsável pelas recaídas precoces observadas em alguns ensaios clínicos de TACTH (TYNDALL e SACCARDI, 2005). Mesmo assim, há evidências de melhora e remissão da DAI após o TACTH apesar da imunoablação incompleta (MURARO e DOUEK, 2006).

Dados obtidos de ensaios clínicos sugerem que o TACTH é viável e pode levar a remissão das DAI. Embora os resultados variem de doença para doença, mais de um terço dos pacientes tem apresentado remissões completas e prolongadas, freqüentemente sem necessidade de uso de drogas imunossupressoras (BURT et al., 2003; POPAT et al., 2005;

TYNDALL et al., 2005; BURT et al., 2008). Em algumas doenças, no entanto, recaídas são relativamente freqüentes. No entanto, dos pacientes que recaem, vários passam a responder aos tratamentos convencionais que não eram efetivos antes do transplante.

O grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Julio César Voltarelli do Centro Regional de Hemoterapia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) têm estudado os mecanismos de ação do TACTH no tratamento de DAI órgão-específicas e analisado as mudanças induzidas no sistema imune do paciente em remissão e recaída após este tipo de transplante. Para tal, recentemente Farias (2006) avaliou a reconstituição imunológica em pacientes transplantados com DM-1 e EM e verificou que esta reconstituição foi alcançada via mecanismos periféricos timo-independentes. Os resultados indicaram uma melhora nos mecanismos reguladores da resposta imune, observado pelo aumento de células T reguladoras, que podem contribuir para o restabelecimento da tolerância imunológica, bem como mudanças qualitativas e quantitativas na composição do repertório de células T nesses pacientes submetidos ao TACTH.

Este projeto faz parte dos estudos sobre os mecanismos de ação da terapia de imunossupressão em altas doses (IAD) seguida do TACTH, avaliando o possível papel de moléculas reguladoras da apoptose celular na patogênese do DM-1 e EM e no restabelecimento da tolerância imunológica após o TACTH, visto que algumas destas moléculas participam ativamente da seleção de repertório de linfócitos e regulação da resposta imune.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar a expressão de genes e proteínas que regulam a maquinaria apoptótica e o seu possível papel na patogênese do *diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) e da esclerose múltipla (EM), bem como determinar o efeito da terapia de imunossupressão em altas doses seguida pelo TACTH na modulação dessas moléculas nos pacientes com DM-1 e EM.

2.2. ESPECÍFICOS

1) Avaliar a expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticos das vias intrínseca e extrínseca e da Família das IAP em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1 e EM nos períodos pré-transplante (pré-mobilização e pré-condicionamento) e pós-transplante (D+180, D+360, D+540 e D+720);
2) Comparar o padrão de expressão dos genes e proteínas anti- e pró-apoptóticos em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com DM-1 e EM ao perfil obtido nos indivíduos saudáveis;
3) Associar os resultados obtidos com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes submetidos à terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. As células mononucleares dos pacientes com DM-1 apresentaram expressão reduzida dos genes *bcl-2*, *bcl-w*, *mcl-1, cIAP-1*, *bad*, *bax* e *fasL* e elevada de *cIAP-2, bid* e *bok* em relação aos controles;

2. A expressão das moléculas anti-apoptóticas *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-*x_L, *mcl-1*, *c-FLIP*$_L$ e *cIAP-1* e das pró-apoptóticas *bax*, *bik*, *bok*, *noxa*, *fas* e *fasL* nos pacientes com DM-1 atingiram níveis similares ao grupo controles, ou seja, a terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH modulou a expressão destes genes;

3. As células mononucleares dos pacientes com DM-1 em remissão clínica da doença apresentaram menor expressão de *bcl-w*, *cIAP-1* e *noxa* do que os pacientes que recaíram pós-IAD/TACTH;

4. A diminuição da expressão das moléculas anti-apoptóticas *a1*, *bcl-2* e *bcl-w* e o aumento das pró-apoptóticas *fas* e *noxa*, correlacionaram-se às porcentagens de hemoglobina glicosilada, concentração de auto-anticorpos GAD65 e níveis séricos de peptídeo-C nos pacientes com DM-1;

5. As células mononucleares dos pacientes com EM apresentaram expressão diminuída dos genes *bcl-w, cIAP-1, bad*, *bax* e *fasL* em relação aos controles e elevada de *a1, cIAP-2, bid*, *bik* e *bok*;

6. A expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-*x_L, *mcl-1*, *c-FLIP*$_L$ e *cIAP-1* e das pró-apoptóticas *bak*, *bax*, *bik*, *noxa* e *fasL* nos pacientes com EM atingiram valores semelhantes ao grupo controle, ou seja, a terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH modulou a expressão destes genes;

7. O perfil de expressão dos genes *bcl-2*, *cIAP-1*, *bad* e *bax* nas células mononucleares dos pacientes com EM em remissão clínica da doença foi diferente dos pacientes em progressão neurológica pós-IAD/TACTH. Os níveis de RNAm dessas moléculas estavam reduzidos nos pacientes que não responderam ao tratamento;

8. O aumento da expressão dos genes pró-apoptóticos *bax*, *bak* e *bim*$_{EL}$ correlacionou-se inversamente aos valores de EDSS dos pacientes com EM após o TACTH;

9. O desequilíbrio de expressão observado quanto as moléculas anti-apoptóticas *cIAP-2* e das pró-apoptóticas *bad*, *bak*, *bax* e *fasL* nos pacientes com DM-1 e EM parece contribuir para a resistência dos linfócitos auto-reativos à apoptose e a sua persistência na circulação;

10. As moléculas pró-apoptóticas Bak, Bad e Bax, de acordo com os dados obtidos em nosso modelo de investigação, provavelmente participam dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia do DM-1 e da EM.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ACHIRON, A. et al. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. **Ann Neurol**, Boston, v. 55, n. 3, p. 410-417, Mar. 2004.

AFFORD, S.; RANDHAWA, S. Reviews: Desmystified Apoptosis. **Mol Pathol**, London, v. 53, n. 2, p. 55-63, Apr. 2000.

ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. et al. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. **J Immunol**, Baltimore, v. 162, n. 9, p. 5205-5211, May 1999.

ALBESIANO, E. et al. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood**, New York, v. 102, n. 9, p. 3333-3339, Nov 2003.

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 1053-1061, Sep. 1999.

AOKI, C. A. et al. NOD mice and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 373-379, Jul. 2005.

ASCHERIO, A.; MUNCH, M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. **Epidemiology**, Baltimore, v. 11, n. 2, p. 220-224, Mar. 2000.

BAECHLER, E. C. et al. Gene expression profiling in human autoimmunity. **Immunol Reviews**, Copenhagen, v. 210, p. 120-137, Apr. 2006.

BETTELLI, E. et al. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat Immunol**, New York, v. 8, n. 4, p. 345-50, Apr. 2007.

BILINSKA, M. et al. Fas expression on T cells and sFas in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand**, Copenhagen, v. 107, n. 6, p. 387-393, Jun. 2003.

BOMPREZZI, R. et al. Gene expression profile im multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. **Hum Mol Genet**, Oxford, v. 12, n. 17, p. 2191-2199, Sep. 2003.

BONNOTTE, B. Pathogenic mechanisms of autoimmune diseases. **Rev Med Interne**, Paris, v. 25, n. 9, p. 648-658, Sep. 2004.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol**, Oxford, v. 39, n. 11, p.615-647, Jan. 2003.

BOUILLET, P. et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis and to preclude autoimmunity. **Science**, Washington, v. 286, n. 5445, p. 1735-1738, Nov. 1999.

BOUILLET, P. et al. BH-3 only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. **Nature**, London, v. 415, n. 6874, p. 922-926, Feb. 2002.

BOYUM, A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 4, n. 4, p. 269-274, 1974.

BRENCHLEY, J. M. et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. **Blood**, New York, v. 101, n. 7, p. 2711-2720, Apr. 2003.

BROADLEY, S. A. et al. Autoimmune disease in first-degree relatives of patients with multiple sclerosis: A UK survey. **Brain**, Oxford, v. 123, n. 6, p. 1102-1111, Jun. 2000.

BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A.; GIACONNE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 11, n. 9, p. 3155-3162, May 2005.

BURT, R. K. et al. Induction of tolerance in autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation: getting closer to a cure? **Blood**, New York, v. 99, n. 3, p. 768-784, Feb. 2002.

BURT, R. K. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. **Arch Neurol**, Chicago, v. 62, n. 6, p. 860-864, Jun. 2005.

BURT, R. K. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: What have we learned? **J Autoimmun**, London, v. 30, n. 3, p. 116-120, May 2008.

CHAO, D. T.; KORSMEYER, S. J. BCL-2-family: regulators of cell death. **Annu Rev Immunol**, Palo alto, v. 16, p. 395-419, 1998.

CHEN, Z et al. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. **J Exp Med**, New York, v. 202, n. 10, p. 1387-1397, Nov. 2005.

CHENG, E. H. et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. **Mol Cell**, Cambridge, v. 8, n. 3, p. 705-711, Sep. 2001.

CHERVONSKY, A. V. Apoptotic and effector pathways in autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 11, n. 6, p. 684-688, Dec. 1999.

CHIPUK, J.E.; GREEN, D.R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends Cell Biol**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 157-164, Apr. 2008.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanatephenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, New York, v. 162, n. 1, p. 156-159, Apr. 1987.

CLOHESSY, J. G. et al. Mcl-1 interacts with truncated bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. **J Biol Chem**, San Francisco, v. 281, n. 9, p. 5750-5759, Mar. 2006.

COMI, C. et al. Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. **Neurology**, Springfield, v. 55, n. 7, p. 921-927, Oct. 2000.

COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **Lancet**, London, v. 359, n. 9313, p. 1221-1231, Apr. 2002.

COOKE, A.; PHILLIPS, J. M.; PARISH, N. M. Tolerogenic strategies to halt or prevent type 1 diabetes. **Nat Immunol**, New York, v. 2, n. 9, p. 810-815, Sep. 2001.

COOKE, A. Th17 Cells in inflammatory conditions. **Rev Diabet Stud**, Duisburg, v. 3, n. 2, p.72-75, Aug. 2006.

COURI, C. E. B.; VOLTARELLI, J. C. Potential role of stem cell therapy in type 1 *diabetes mellitus*. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 2, p. 407-415, Mar. 2008.

DAVIDSON, A.; DIAMOND, B. Autoimmune diseases. **N Engl J Med**, Boston, v. 345, n. 5, p. 340-350, Aug. 2001.

DE KLEER, I. et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. **Blood**, New York, v. 107, n. 4, p. 1696-1702, Feb. 2006.

DE MARIA, R.; TESTI, R. Fas-FasL interactions: a common pathogenic mechanism in organ-specific autoimmunity. **Immunol Today**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 121-125, Mar. 1998.

DECALLONE, B. et al. Defect in activation-induced cell death in non-obese diabetic (NOD) T lymphocytes. **J Autoimmun**, London, v. 20, n. 3, p. 219-226, May 2003.

DECALLONE, B.; MATHIEU, C. Defective activation-induced cell death in NOD T lymphocytes: 1,25-dihydroxyvitamin D3 restores defect. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v. 1005, p. 176-177, Nov. 2003.

DEFRANCO, S. et al. Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. **Diabetes**, New York, v. 50, n. 3, p. 483-488, Mar. 2001.

DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 3, p. 239-252, Feb. 1999.

DIJKERS, P. F. et al. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. **Curr Biol**, Cambridge, v. 10, n. 19, p. 1201-1204, Oct. 2000.

DOMENICK, M. A.; ILDSTAD, S. T. Impact of bone marrow transplantation on type I diabetes. **World J Surg**, New York, v. 25, n. 4, p. 474-80, Apr. 2001.

EISENBARTH, G. S. Update in type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v. 92, n. 7, p. 2403-2407, Jul. 2007.

EFFROS, R. B.; PAWELEC, G. Replicative senescence of T cells: does the hayflick limit lead to immune exhaustion? **Immunol Today**, Amsterdam, v. 18, n. 9, p. 450–454, Sep. 1997.

EGUCHI, K. Apoptosis in autoimmune diseases. **Intern Med**, Tokyo, v. 40, n. 4, p. 275-284, Apr. 2001.

ENDERS, A. et al. Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. **J Exp Med**, New York, v. 198, n. 7, p. 1119-1126, Oct. 2003.

ERMANN, J.; FATHMAN, C. G. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. **Nat Immunol**, New York, v. 2, n. 9, p. 759-761, Sep. 2001.

EARNSHAW, W. C. et al. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. **Annu Rev Biochem**, Palo Alto v. 68, p. 383-424, 1999.

EWINGS, K. E. et al. ERK1/2-dependent phosphorylation of Bim(EL) promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-x(L). **EMBO J**, Oxford, v. 26, n. 12, p. 2856-2867, Jun. 2007.

FARGE, D. et al. Analysis of immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation in systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 52, n. 5, p. 1555-1563, May 2005.

FARIAS, K. C. R. M. Avaliação da reconstituição imunológica em pacientes com diabete melito do tipo 1 e esclerose múltipla após transplante autólogo de células tronco hematopoéticas. 2006. 286f. Tese de Doutorado- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ**, Ottawa, v. 175, n. 2, p. 165-170, Jul. 2006.

GIORDANO, C. et al. Defective expression of the apoptosis-inducing CD95 (Fas/APO-1) molecule on T and B-cells in IDDM. **Diabetologia**, Berlin, v. 38, n. 12, p. 1449-1454, Dec. 1995.

GLEICHER, N.; BARAD, D. H. Gender as risk factor for autoimmune diseases. **J Autoimmun**, London, v. 28, n. 1, p. 1-6, Feb. 2007.

GOMES, A. C. et al. Upregulation of the apoptosis regulators c-FLIP, CD95 and CD95 ligand in peripheral blood mononuclear cells in relapsing-remitting multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 135, n. 1-2, p. 126-134, Feb. 2003.

GOODNOW, C. C. et al. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature**, London, v. 435, n. 7042, p.590-597, Jun. 2005.

GRONSKI, M.; WEINEM, M. Death pathways in T cell homeostasis and their role in autoimmune diabetes. **Rev Diabet Stud**, Duisburg, v. 3, n. 2, p. 88-95, Aug. 2006.

GUSTAFSSON, A. B.; GOTTLIEB, R. A. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. **Am J Physiol Cell Physiol**, Bethesda, v. 292, n. 1, p. C45-C51, Jan. 2007.

HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **J Clin Invest**, New Haven, v. 113, n. 6, p. 788–794, Mar. 2004.

HAFLER, D. A. et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. **N Engl J Med**, Massachusetts, v. 357, n. 9, p. 851-862, Aug. 2007.

HAYASHI, T.; FAUSTMAN, D. L. Implications of altered apoptosis in diabetes mellitus and autoimmune disease**. Apoptosis**, London, v. 6, n. 1-2, p. 31-45, Apr. 2001.

HEBB, A. L. O. et al. Expresssion of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination. **Mult Scler**, v. 14, n. 5, p. 577-594, Jun. 2008.

HOHLFELD, R.; WEKERLE, H. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 101, n. 5, p. 14599-14606, Oct. 2004.

HONG, J. et al. Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 152, n. 1-2, p. 126-139, Jul. 2004.

HUANG, W-X. et al. Apoptosis mediators FasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in MS. **Neurology**, Minneapolis, v. 55, n. 7, p. 928-934, Oct. 2000.

HÜBNER, A.; BARRET, T.; FLAVELL, R. A.; DAVIS, R. J. Multisite phosphorylation regulates bim stability and apoptotic activity. **Mol Cell**, Cambridge, v. 30, n. 4, p. 415-425, May 2008.

HUGHES, P. et al. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. **Immunity**, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 197-205, Feb. 2008.

HUGHES, P.; BOUILLET, P.; STRASSER, A. Role of Bim and other Bcl-2 members in autoimmune and degenerative diseases**. Curr Dir Autoimmmun**, New York, v. 9, p. 74-94, 2006.

JAMESON, S. C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. **Nat Rev Immunol**, London, v. 2, n. 8, p. 547-556, Aug. 2002.

JIANG, A.; CLARK, E. A. Involvement of Bik, a proapoptotic member of the Bcl-2 family, in surface mediated B cell apoptosis. **J Immunol**, Baltimore, v. 166, N. 10, p. 6025-6033, May 2001.

KAMRADT, T.; MITCHISON, N. A. Review: Tolerance and autoimmunity. **N Engl J Med**, Boston, v. 344, n. 9, p. 655-664, Mar. 2001.

KAWAKAMI, A.; EGUCHI, K. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. **Med Electron Microsc**, Moriguchi, v. 35, n. 1, p. 1-8, Mar. 2002.

KIKLY K. et al. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 18, n. 6, p. 670-675, Dec. 2006.

KIM, S. K. et al. Prevention of type 1 diabetes transfer by glutamic acid decarboxylase 65 peptide 206-220-specific T cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 101, n. 39, p. 14204-14209, Sep. 2004.

KISHIMOTO, H.; SPRENT, J. A defect in central tolerance in NOD mice. **Nat Immunol**, New York, v. 2, n. 11, p. 1025-1031, Nov. 2001.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, London, v. 407, n. 6805, p. 789-795, Oct. 2000.

KRAMMER, P. H.; ARNOLD, R.; LAVRIK, I. N. Life and death in peripheral T cells. **Nat Rev Immunol**, London, v. 7, n. 7, p.532-542, Jul. 2007.

KRONENBERG, M.; RUDENSKY, A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. **Nature**, London, v. 435, n. 7042, p. 598-604, Jun. 2005.

KÜHTREIBER, W. M.; HAYASHI T.; DALE, E. A.; FAUSTMAN, D. L. Central role of defective apoptosis in autoimmunity. **J Mol Endocrinol**, Bristol, v. 31, n. 3, p. 373-399, Dec. 2003.

KURTZKE J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, Minneapolis, v. 33, n. 11, p. 1444-1452, Nov. 1983.

LAAKSONEN, M. et al. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis –a Finnish family study. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 140-145, Jan. 2002.

LAMHAMEDI-CHERRADI, S. E. et al. Resistance of T-cells to apoptosis in autoimmune diabetic (NOD) mice is increased early in life and is associated with dysregulation of Bcl-x. **Diabetologia**, Berlin, v. 41, n. 2, p. 178-184, Feb. 1998.

LEI, K. ; DAVIS, R. J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl-2 family induces Bax-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA, v. 100, p. 2432-2437, 2003.

LEY, R. ; EWINGS, K. E. ; HADFIELD, K. ; COOK, S. J. Regulatory phosphorylation of Bim : sorting out the ERK from the JNK. **Cell Death Differ**, London, v. 12, n. 8, p. 1008-1014, Aug. 2005.

LEV, N. et al. Bax-ablation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 359, n. 3, p. 139-142, Apr. 2004.

LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, Cambridge, v. 91, n. 4, p. 479-489, Nov. 1997.

LINDLEY, S. et al. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+)T cells from patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, New York, v. 54, n. 1, p. 92-99, Jan. 2005.

LINDSTEN, T. et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2-family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. **Mol Cell**, Cambridge, v. 6, n. 6, p. 1389-1399, Dec. 2001.

LIPHAUS, B. L. ; KISS, M. H. B. ; CARRASCO, S. ; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C. Increased Fas and Bcl-2 expression on peripheral blood T and B lymphocytes from juvenile-onset systemic lupus erythematosus, but not from juvenile rheumatoid arthrits and juvenile dermatomyositis. **Clin Dev Immunol**, Abingdon, v. 13, n. 2-4, p. 283-287, Dec. 2006.

LIPHAUS, B. L. ; KISS, M. H. B. ; CARRASCO, S. ; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C. Increased Fas and Bcl-2 expression on peripheral mononuclear cells from patients with active juvenile-onset systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**, Toronto, v. 34, n. 7, p. 1580-1584, Jul. 2007.

LIU, H. ; POPE, R. M. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Pharmacol**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 317-322, Jun. 2003.

LIU, H. et al. Mcl-1 is essential for the survival synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. **J Immunol**, Baltimore, v. 175, n. 12, p. 8337-8345, Dec. 2005.

LIU et al. Regulation of Mcl-1 expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. **Arthritis e Rheumatism**, v. 54, n. 10, p. 3174-3181, Oct. 2007

LOPATINSKAYA, L. et al. The development of clinical activity in relapsing-remitting MS is associated with a decrease of FasL mRNA and an increase of Fas mRNA in peripheral blood. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 138, n. 1-2, p. 123-131, May 2003.

LUBLIN F. D.; REINGOLD S. C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. **Neurology**, Minneapolis, v. 46, n. 4, p. 907-911, Apr. 1996.

LUTTON, J. D.; WINSTON, R.; RODMAN, T. C. Multiple Sclerosis: etiological mechanisms and future directions. **Exp Biol Med**, Maywood, v. 229, n. 1, p. 12-20, Jan. 2004.

MAAS, K. et al. Cutting edge: Molecular portrait of human autoimmune disease. **J Immunol**, Baltimore, v. 169, n. 1, p. 5-9, Jul. 2002.

MACKAY, I. R.; LESKOVSEK, N.V.; ROSE, N.R. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. **J Autoimmun**, London, v. 30, n. 1-2, p. 5-11, Mar. 2008.

MANDAL, M. et al. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. **J Exp Med**, New York, v. 201, n. 4, p. 602-614, Feb. 2005.

MARRACK, P.; KAPPLER, J.; KOTZIN, B. L. Autoimmune disease: why and where it occurs. **Nat Med**, New York, v. 7, n. 8, p. 899-905, Aug. 2001.

MASTELLER, E. L.; BLUESTONE, J. A. Immunotherapy of insulin-dependent diabetes mellitus. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 652-659, Oct. 2002.

MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. Beta-cell death during progression to diabetes. **Nature**, London, v. 414, n. 6865, p. 792-798, Dec. 2001.

MAURICIO, D.; MANDRUP-POULSEN, T. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. **Diabetes**, New York, v. 47, n. 10, p. 1537-1543, Oct. 1998.

MICHEAU, O. et al. NF-κB signals induce the expression of c-FLIP. **Mol Cell Biol**, Washington, v. 21, n. 16, p. 5299-5305, Aug. 2001.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell,** Cambridge, v. 80, n. 2, p. 293-299, Jan. 1995.

MOK C. L. et al. Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. **J Exp Med**, New York, v. 189, n. 3, p. 575-586, Feb. 1999.

MONTEIRO, J. et al. Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts. **J Immunol**, Baltimore, v. 156, n. 10, p. 3587-3590, May 1996.

MOUNTZ, J. D. et al. Autoimmune disease results from multiple interactive defects in apoptosis induction molecules and signaling pathways. **Behring Inst Mitt**, Marburg, v. 97, p. 200-219, Oct. 1996.

MÜLLAUER, L. et al. Mutations in apoptosis genes: a pathogenic factor for human disease. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 488, n. 3, p. 211-231, Jul. 2001.

MUNOZ, L.E. et al. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Hampshire, v. 17, n. 5, p. 371-375, 2008.

MURARO, P. A. et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. **J Exp Med**, New York, v. 201, n. 5, p. 805-816, Mar. 2005.

MURARO, P. A.; DOUEK, D. C. Renewing the T cell repertoire to arrest autoimmune aggression. **Trends Immunol**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 61-67, Feb. 2006.

MURARO, P. A.; MARTIN, R. Immunological questions on hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. **Bone Marrow Transplant**, Hampshire, v. 32, Suppl 1, S41–S44, Aug. 2003

NARENDRAN, P.; ESTELLA, E.; FOURLANOS, S. Immunology of type 1 diabetes. **QJM**, Oxford, v. 98, n. 8, p. 547-556, Aug. 2005.

NEWTON, K.; STRASSER, A. The Bcl-2-family and cell death regulation. **Curr Opin Genet Dev**, London, v. 8, n. 1, p. 68-75, Feb. 1998.

OHASHI, P. S. Negative selection and autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 15, n. 6, p. 668-676, Dec. 2003.

OKUDA, Y. et al. The suppression of T cell apoptosis influences the severity of disease during chronic phase but not the recovery from the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 131, n. 1-2, p. 115-125, Oct. 2002.

OKUDA Y.; APATOFF, B. R.; POSNETT, D. N. Apoptosis of T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is associated with disease activity of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 171, n. 12, p. 163-170, Feb. 2006.

OPFERMAN J. T. et al. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. **Nature**, London, v. 426, n. 6967, p. 671-676, Dec. 2003.

OPFERMAN, J. T.; KORSMEYER, S. J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nat Immunol**, New York, v. 4, n. 5, p. 410-415, May 2003.

OPFERMAN J. T. Apoptosis in the development of the immune system. **Cell Death Differ**, London, v. 15, n. 2, p. 234-242, Feb. 2008.

PALMER, J. P. et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve β-cell function. **Diabetes**, New York, v. 53, n. 1, p. 250-264, Jan. 2004.

PENDER, M. P.; GREER, J. M. Immunology of multiple sclerosis. **Curr Allergy Asthma Rep**, Philadelphia, v. 7, n. 4, p. 285-292, Jul. 2007.

POPE, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, London, v. 2, n. 7, p. 527-535, Jul. 2002.

POSER, C. M. et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. **Ann Neurol**, Boston, v. 13, n. 3, p. 227-231, Mar. 1983.

PROTOPSALTIS, J. et al. Correlation between increased serum sFas levels and microalbuminuria in type 1 diabetic patients. **Med Princ Pract**, Basel, v. 16, n. 3, p. 222-225, 2007.

PRUD'HOMME, G. J.; DRAGHIA-AKLI, R.; WANG, O. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. **Gene Ther**, Houndmills, v. 14, n. 7, p. 553-564, Apr. 2007.

RANGER, A. M.; MALYNN, B. A.; KORSMEYER, S. J. Mouse models of cell death. **Nat Genet**, New York, v. 28, n. 2, p. 113-118, Jun. 2001.

RANGER, A. M. et al. Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 100, n. 16, p. 9324-9329, Aug. 2003.

RATHMELL, J. C. et al. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. **Nat Immunol**, New York, v. 3, n. 10, p. 932-939, Oct. 2002.

REED, J. C. et al. Comparative analysis of apoptosis and inflamation genes of mice and humans. **Genome Res**, New York, v. 13, n. 6B, p. 1376-1388, Jun. 2003.

REFAELI, Y. L. et al. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. **Immunity**, Cambridge, v. 8, n. 5, p. 615-623, May 1998.

RIETZ, C. et al. Overexpression of Bcl-2 in T cells affects insulitis in the nonobese diabetic mouse. **Scand J Immunol**, Baltimore, v. 57, n. 4, p. 342-349, Apr. 2003.

RIOUX, J. D.; ABBAS, A. K. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. **Nature**, London, v. 435, n. 7042, p. 584-589, Jun. 2005.

RODACKI, M. et al. Dosagem do peptídeo C sérico ao acaso em adultos com diagnóstico clínico de *diabetes mellitus* tipo 1. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 3, p. 238-241, 2008.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol**, New York, v. 6, n. 4, p. 345-352, Apr. 2005.

SALMENA, L. et al. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 17, n. 7, p. 883-895, Apr. 2003.

SANDALOVA E. et al. Regulation of expression of Bcl-2 protein family member Bim by T cell receptor triggering. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 101, n. 9, p. 3011-3016, Mar. 2004.

SATOH, J. et al. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. **Neurobiol Dis**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 537-550, Apr. 2005.

SCAFFIDI, C. et al. Apoptosis signaling in lymphocytes. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 277-285, Jun. 1999.

SCHWARTZ, P. S.; WAXMAN, D. J. Cyclophosphamide Induces Caspase 9-Dependent Apoptosis in 9L Tumor Cells. **Mol Pharmacol**, Bethesda, v. 60, n. 6, p. 1268–1279, Dec. 2001.

SEGAL, B. M.; CROSS, A. H. Fas(t) track to apoptosis in MS: TNF receptors may suppress or potentiate CNS demyelination. **Neurology**, Minneapolis, v. 55, n. 7, p. 906-907, Oct. 2000.

SEIDI, O. A.; SHARIEF, M. K. The expression of apoptosis-regulatory proteins in B lymphocytes from patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 130, n. 1-2, p. 202-210, Sep. 2002.

SELMI, C. One year in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 85-93, Nov. 2007.

SEMRA, Y. K.; SEIDI, O. A.; SHARIEF, M. K. Overexpression of the apoptosis inhibitor FLIP in T cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 268-274, Feb. 2001.

SERAFINI, B. et al. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. **Brain Pathol**, Zürich, v. 14, n. 2, p. 164-174, Apr. 2004.

SHARIEF, M. K.; SEMRA, Y. K. Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 119, n. 2, p. 350-357, Oct. 2001.

SHARIEF, M. K. et al. The expression of pro- and anti-apoptosis Bcl-2 family proteins in lymphocytes from patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 155-162, Apr. 2002.

SHARIEF, M. K.; MATTHEWS, H.; NOORI, M. A. Expression ratios of the Bcl-2 family proteins and disease activity in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 158-165, Jan. 2003.

SHARMA, K. et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacol Ther**, Oxford, v.88, n. 3, p.333-347, Dec. 2000.

SILVA, D. G. et al. Mechanisms of accelerated immune-mediated diabetes resulting from islet beta cell expression of Fas ligand transgene. **J Immunol**, Baltimore, v. 170, n. 10, p. 4996-5002, May 2003.

SIEGEL, R. M.; FLEISHER, T. A. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 103, n. 5, p. 729-738, May 1999.

SINGER, G. G.; ABBAS, A. K. The fas antigen is involved in peripheral but not in thymic delection of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. **Immunity**, Cambridge, v. 1, n .5, p. 365-371, Aug. 1994.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, New York, v. 150, n. 1, p. 76-85, Oct. 1985.

SOHN, S. J.; THOMPSON, J.; WINOTO, A. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 19, n. 5, p. 510-515, Oct. 2007

SOLARY, E.; DUBREZ, L.; EYMIN, B. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 9, n. 6, p. 1293-1305, Jun. 1996.

STRASSER, A. et al. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. **EMBO J**, Oxford, v. 14, n. 24, p. 6136-6147, Dec. 1995.

STRASSER, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. **Nat Rev Immunol**, London, v. 5, n. 3, p. 189-200, Mar. 2005.

STRASSER, A.; BOUILLET, P. The control of apoptosis in lymphocyte selection. **Immunol Rev**, Copenhagen, v. 193, p. 82-92, Jun. 2003.

SU, X. et al. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. **J Immunol**, Baltimore, v. 164, n. 5, p. 2523-2532, Mar. 2000.

SUN, W. et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire and myelin-reactive T cells reconstituted from autologous haematopoetic stem-cell grafts in multiple sclerosis. **Brain**, London, v. 127, n. 5, p. 996-1008, May 2004.

SYKES, M.; NIKOLIC, B. Treatment of severe autoimmune disease by stem cell transplantation. **Nature**, London, v. 435, n. 7042, p. 620-627, Jun. 2005.

TAKEUCHI, O. et al. Essential role of Bax, Bak in B cell homeostasis and prevention of autoimmune disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 102, n. 32, p. 11272-11277, Aug. 2005.

TENEV T. et al. IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms. **Nat Cell Biol**, London, v. 7, n. 1, p. 70-77, Jan. 2005.

TSEVELEKI et al. Cellular FLIP (long isoform) overexpression in T cells drives Th2 effector responses and promotes immunoregulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, Baltimore, v. 173, n. 11, p. 6619-6626, Dec. 2004.

THOMAS, D.; ZACCONE, P.; COOKE, A. The role of regulatory T cell defects in type 1 diabetes and the potential of these cells for therapy. **Rev Diabet Stud**, Duisburg, v. 2, n. 1, p. 9-18, May 2005.

TODARO, M.; ZEUNER, A; STASSI, G. Role of apoptosis in autoimmunity. **J Clin Immunol**, New York, v. 24, n. 1, p. 1-11, Jan. 2004.

TOMAYKO M. M. et al. Expression of the Bcl-2 family member A1 is developmentally regulated in T cells. **Int Immunol**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 1753-1761, Nov. 1999.

TRAPP, B. D.; NAVE, K. A. Multiple sclerosis: na immune or neurodegenerative disorder? **Annu Rev Neurosci**, Palo Alto, v. 31, p. 247-269, 2008.

TYNDALL, A.; SACCARDI, R. Hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease - results from phase I/II studies, prospective randomized trials and future directions. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 141, n. 1, p. 1-9, Jul. 2005.

VAUX, D. L.; FLAVELL, R. A. Apoptosis genes and autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 12, n. 6, p. 719-724, Dec. 2000.

VERSCHELDE C. et al. Overexpression of the antiapoptotic protein A1 promotes the survival of double positive thymocytes awaiting positive selection. **Cell Death Differ**, London, v. 13, n. 7, p. 1213-1221, Jul. 2006.

VILLUNGER, A.; SCOTT, C.; BOUILLET, P.; STRASSER, A. Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival. **Blood**, New York, v. 101, n. 6, p. 2392-2400, Mar. 2003.

VIRLEY, D. J. Developing therapeutics for the treatment of multiple sclerosis. **NeuroRx**, Milwaukee, v. 2, n. 4, p. 638-649, Oct. 2005.

VOLL, R. E. et al. NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. **Immunity**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 677-689, Nov. 2000.

VOLTARELLI, J. C. Transplante de células-tronco hematopoéticas no *diabetes mellitus* do tipo I. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Rio de Janeiro**,** v. 26, p. 43-45, 2004.

VOLTARELLI, J. C. et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, Chicago, v. 297, n. 14, p. 1568-1576, Apr. 2007.

WANG, C. Y. et al. NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. **Science**, Washington, v. 281, n. 11, p. 1680-1683, Sep. 1998.

WAICZIES, S. et al. Elevated Bcl-xL levels correlate with T cell survival in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 213-220, May 2002.

WILLIAMS JR, R. C. Autoimmune disease etiology – a perplexing paradox or a turning leaf? Autoimmun Rev, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 204-208, Mar. 2007.

WHITE, C. A.; NGUYEN, K. B.; PENDER, M. P. B cell apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of B cell CD95, CD95L and Bcl-2 expression. **J Autoimmun**, London, v. 14, n. 3, p. 195-204, May 2000.

WILLIS, S. N.; ADAMS, J. M. Life in the balance: how BH-3-only proteins induce apoptosis. **Curr Opin Cell Biol**, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 617-625, Dec. 2005.

WILLIS, S. N. et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**, New York, v. 315, n. 5813, p. 856-859, Feb. 2007.

WEI, M. C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, New York, v. 292, n. 5517, p. 727-730, Apr. 2001.

YAKOVLEV A. G. et al. Bok and Noxa are essential mediators of p53-dependent apoptosis. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 279, n. 27, p. 28367-28374, Jul. 2004.

YANG, Y. L. ; LI, X. M. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. **Cell Res**, Beijing, v. 10, n. 3, p. 169-177, Sep. 2000.

YIN, X. M. et al. Bid-deficient mice are resistent to Fas-induced hepatocellular apoptosis. **Nature**, London, v. 400, n. 6747, p. 886-891, Aug. 1999.

YOKOYAMA T. et al. The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes. **Immunol Lett**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 107-113, Apr. 2002.

ZANDMAN-GODDARD, G.; PEEVA, E.; SHOENFELD, Y. Gender and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, Amsterdam, v. 6, n. 6, p. 366-372, Jun. 2007.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **J Clin Invest**, New Haven, v. 116, n. 7, p. 2022-2032, Jul. 2006.

ZHANG N.; HE Y. W. An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. **J Exp Med**, New York, v. 202, n. 3, p. 395-404, Aug. 2003.

ZHENG, B. et al. Overexpression of Bcl-(XL) in B cells promotes Th1 response and exacerbates collagen-induced arthritis. **J Immunol**, Baltimore, v. 179, n. 10, p. 7087-7092, Nov. 2007.

ZIPP, F. et al. Serum CD95 of relapsing remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis. **J Neuroimmunol**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 151-154, Jun. 1998.

ZIPP, F. Apoptosis in multiple sclerosis. **Cell Tissue Res**, Berlin, v. 301, n. 1, p. 163-171, Jul. 2000.

ZONG, W. X. et al. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-κB that blocks TNFα-induced apoptosis. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 4, p. 382-387, Feb. 1999.

ZONG, W. X. et al. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax or Bak. **Science**, New York, v. 15, n. 12, p. 1481-1486, Jun. 2001.

ZUCCHELLI, S. et al. Defective central tolerance induction in NOD mice: Genomics and genetics. **Immunity**, Cambridge, v. 22, n. 3, p. 385-396, Mar. 2005.

ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do projeto pelo comitê de ética do HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

50 anos
USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 25 de abril de 2007

Ofício nº 1350/2007
CEP/MGV

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS PRÓ E ANTI-APOPTÓTICOS EM PACIENTES COM DIABETE MELITO DO TIPO 1 E ESCLEROSE MÚLTIPLA SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 245ª Reunião Ordinária realizada em 23/04/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 14105/2006.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
FABÍOLA ATTIÉ DE CASTRO
GISLANE LELIS VILELA DE OLIVEIRA (Aluna)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos indivíduos controles.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Via do Café, s/n - 14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Tel.: +55 16 3602-4273 - Fax: +55 16 3602-4881

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome: _____ **Idade:** _____ **Sexo:** _____
Responsável legal: _____
RG do doador: _____ **Data de nascimento:** _____

Título do Projeto de pesquisa: "Avaliação da expressão de genes e proteínas anti- e pró apoptóticos em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas"

Responsável clínico pelo Projeto: Prof. Dr. Julio César Voltarelli

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP (telefone: 016-36020657)
Profa. Dra. Simone Kashima Haddad, Centro Regional de Hemoterapia
Dra. Kelen Cristina Malmegrim de Farias, Centro Regional de Hemoterapia
Gislane Lelis Vilela de Oliveira: Aluna de mestrado da FCFRP-USP
Telefone comitê de ética: 016-36022228

Justificativa, Objetivos e Procedimentos do Projeto:

As doenças auto-imunes surgem de alterações na resposta imunológica (defesa do corpo), ou seja, células de defesa de seu organismo começam a atacar suas próprias células e tecidos do corpo. Estas doenças atingem cerca de 5 a 8% da população mundial e existem mais de 70 delas identificadas, constituindo importante causa de morte. Várias delas são difíceis de tratar e de curar, representando um problema econômico-social, pois afetam freqüentemente adultos jovens e principalmente as mulheres.

Esse projeto de pesquisa estudará sangue de pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 1 e Esclerose Múltipla que serão ou foram submetidos ao transplante autólogo de células tronco hematopoéticas para tratamento da doença na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) e de indivíduos

saudáveis doadores de sangue do centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (controles do estudo).

Prezado doador de sangue, como o senhor(a) é saudável, a função deste termo é convidá-lo(a) a participar desta pesquisa. Caso você aceite participar, além da doação de seu sangue para o Centro Regional de Hemoterapia você também doará mais 20 ml de sangue para esse estudo. Nesse estudo será realizada a observação de proteínas e genes ligados ao funcionamento da vida das células que defendem nosso organismo contra doenças. A amostra do seu sangue será utilizada apenas para esta pesquisa e os resultados obtidos com a pesquisa de seu sangue serão comparados aos resultados obtidos com a avaliação do sangue dos pacientes com Diabetes Mellitus do tipo I e Esclerose múltipla. A colheita de sangue será realizada por profissionais capacitados (enfermeiros, biomédicos ou farmacêuticos) com material descartável para que não haja riscos de contaminação. Os riscos dessa colheita serão mínimos, existindo uma pequena possibilidade de aparecimento de hematoma (inchaços roxos) ou inchaços. Todas as informações sobre a análise de seu sangue serão mantidas em sigilo.

Os dados serão armazenados em um computador sem identificação e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação literária. A sua participação neste estudo é voluntária. Caso você não queira participar não tem problema, você não sofrerá preconceito e seu processo de doação de sangue no hemocentro não será afetado. Se você aceitar poderá retirar-se do estudo em qualquer momento, se assim desejar.

Eu, _____, declaro que concordei voluntariamente em participar no projeto de pesquisa acima referido e fui devidamente informado em detalhes pelos responsáveis do projeto sobre os meus direitos, tais como:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa da qual participarei;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga preconceito ou prejuízos;
3. A segurança de que não serei identificado e de que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
4. O compromisso de me informar sobre resultados de todos os testes realizados, se assim o desejar;
5. A indenização que legalmente teria direito em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa.

Assinatura do doador: _____

Assinatura do responsável pela pesquisa: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.