UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune

Flávia Porto Pelá

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia
Orientada: Flávia Porto Pelá
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão Corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutora em Ciências no dia 24 de abril de 2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

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.

Pelá, Flávia Porto.

Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune. Ribeirão Preto, 2017.

122p.; 30 cm.

Tese Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marcelo Dias Baruffi

Palavras-Chaves: 1. Diabetes *mellitus* tipo 1; 2. Galectina-1. 3. Antígeno Leucocitário Humano – G. 4. Imunoregulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Flávia Porto Pelá

Título do Trabalho: Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune

Tese Doutorado apresentada ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicado à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____ Assinatura:_____

"Improve, Adapt, Overcome"

Marine Corps

"Tudo o que pode fazer ou sonha que pode, comece.

A audácia contém gênio, poder e magia"

W.H.Murray

Dedicatória

“Aos meus pais, Selma e Luiz (in memoriam) por terem se dedicado,cada um ao seu modo, à minha vida e à de meus irmãos, nos permitindo acreditar, diariamente, na concretização de projetos audaciosos, sonhos “impossíveis”, em aventuras destemidas e, principalmente, no ser humano e no amor. Ainda dedico o presente trabalho ao meu filho Guilherme, meu melhor presente e maior inspiração.”

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, pela orientação do desenvolvimento do presente trabalho e pela dedicação e dom em nos ensinar. Obrigada pelos incentivos e discussões científicas.

Às colaboradoras Profa. Dra. Maria Cristina Nonato, Prof. Dr. Norberto Pepporini Lopes, Prof. Dr. José Cesár Rosa, Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz, Dra. Daniela Carlos pela disponibilização dos recursos laboratoriais para desenvolvimento de parte deste trabalho e colaboração acadêmico-científico. Muito obrigada!

Ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por contribuir com a minha formação profissional.

Aos Pós-Doutores Camillo Del Cistia, Ibrahim Abiodoun, Joane Rustiguel, Juliana Doblas Massaro, Lilian Cataldi Rodrigues, Luana Soares, Thalita Riul, muito obrigada por toda colaboração científica.

Aos colegas do grupo de Glicoimunobiologia que estiveram comigo durante esses quatro anos, contribuindo direta ou indiretamente na realização do presente trabalho.

Aos queridos, Wânia Tavares, Luciana Ambrósio e Luiz Chaim pelos deliciosos quitutes que nos espairecem.

Aos colegas do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sempre dispostos a me auxiliaram nos experimentos, principalmente, daqueles emergenciais.

À minha mãe, Selma Maitino Porto, sempre disposta a acalentar, ensinar e, principalmente, a me amar incondicionalmente. Gratidão eterna!

Ao meu pai, Luiz Alberto Pelá, cujo silêncio vem me ensinando a não procrastinar, seja nos projetos profissionais e pessoais, seja na demonstração dos sentimentos.

Ao meu maior e melhor amor, meu filho, Guilherme Porto Pelá Amâncio, cujo sorriso me alegra o coração, fortalece a alma e me inspira aos meus melhores sonhos.

Aos meus irmãos, Daniel Porto Pelá e Luiz Fernando Porto Pelá, pelo companheirismo e amizade de todas as horas.

Ao meu padrasto, Valdir Silva Abrão, e, ao amigo, Marcelo Puga, ambos tão providenciais em seus ensinamentos e palavras.

Aos meus amigos queridos que próximos, distantes, daqui ou dali, sempre são tão especiais e ímpares na minha vida, sejam com palavras, abraços, cafés, brigadeiros... Cada um ao seu modo complementando a diversão da vida.

Especialmente, agradeço a Deus pela vida; pelas bênçãos diárias que provêem paz e esperança, principalmente, nos momentos em que me acho insuficiente para solucionar os contratempos que a vida impõe; pelas oportunidades e desafios que me fortalecem, qualificam e me tornam um ser humano melhor.

RESUMO

Pelá, F. P. **Estudo das moléculas imunorregulatórias Galectina-1 e Antígeno Leucocitário Humano-G: da construção de ferramentas ao impacto no diabetes autoimune.** 2017. 122 f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O diabetes *mellitus* tipo 1A (DM1) é uma doença crônica caracterizada pela destruição imunológica das células β do pâncreas e pela incapacidade de seu portador produzir insulina. Nas últimas décadas foram descritos vários aspectos sobre a fisiopatologia do DM1 e identificado um aumento de sua incidência mundial. Entretanto, na literatura há lacunas a serem respondidas envolvendo a etiologia e a imunopatologia desta doença. No presente trabalho, foi analisado o impacto de duas moléculas endógenas imunoregulatórias, Antígeno Leucocitário Humano-G (HLA-G) e Galectina-1 (GAL-1), no DM1 humano e experimental. Para tanto, as formas recombinantes de HLA-G (-G5 e -G6) e seus respectivos anticorpos foram produzidos e/ou bioquimicamente caracterizados. A partir de amostras de pacientes diagnosticados com DM1 ou de indivíduos controle foi feita uma análise comparativa envolvendo o perfil de expressão do HLA-G e da GAL-1 e a identificação de microRNAs (miRNAs) associados a estas duas moléculas. Camundongos $Lgals^{-/-}$ ou não para o gene da GAL-1 foram tratados com estreptozotocina (STZ) para indução do DM1 experimental. As duas formas recombinantes do HLA-G foram produzidas, mas apenas o HLA-G6 foi caracterizado como uma solução polidispersa contendo um componente majoritário (99,2%) com massa molecular de 23.603,766 Da, raio hidrodinâmico de 6,0 ± 2,0 nm e imunoreatividade para diferentes anticorpos anti-HLA-G comerciais ou produzidos no laboratório. Os níveis transcricional e proteico do HLA-G e da GAL-1 não foram diferentes entre os grupos de indivíduos estudados. A análise comparativa de miRNAs mostrou que a elevada indução do miRNA modulador negativo da expressão do HLA-G (hsa-miR-16-5p) nos controles em relação aos pacientes foi a única associação robusta com a patogenia do DM1. Curiosamente, os animais selvagens apresentam maior suscetilibilidade à indução de DM1 por STZ, uma vez que os indicadores desta doença como o grau de insulite, a taxa de migração de linfócitos T CD4 e T CD8 para os linfonodos pancreáticos, o nível de redução de insulina no pâncreas e a taxa glicêmica estavam aumentados nesses animais em relação aos nocautes para GAL-1. Finalmente, este conjunto de resultados sugere que possa ocorrer uma regulação positiva da expressão de transcritos do HLA-G em pacientes com DM1 e que a presença de GAL-1 endógena pode favorecer o DM1 experimental. Estes dados abrem novas perspectivas para o melhor entendimento da imunopatologia do DM-1.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 1, Galectina-1, Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G), Imunoregulação.

ABSTRACT

Pelá, F. P. **Galectin-1 and Human Leukocyte Antigen-G: from tool** Pelá, F. P. **Study of the immunoregulatory molecules Galectin-1 and Human Leukocyte Antigen-G: from tool development to impact on autoimmune diabetes.** 2017. 122 p. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Diabetes Mellitus type 1A (DM1) is a chronic disease characterized by the immune destruction of pancreatic beta cells and by the consequent inability of its bearer to produce insulin. For the last decades, several aspects of the pathophysiology of DM1 were described and an increase on its worldwide incidence has been identified.Nevertheless, there are gaps in the literature related to aspects of its etiology and immunopathology to be filled.In the present work, the impact of two endogenous immunoregulatory molecules, Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) and Galectin-1 (GAL-1), was analyzed on human and experimental DM1.To do so, the recombinant forms of HLA-G (-G5 and -G6) and its respective antibodies were produced and/or biochemically characterized. A comparative analysis involving the expression profile of HLA-G and GAL-1 and the identification of microRNAs (miRNAs) associated with these two molecules was made from samples of patients diagnosed with DM1, or control subjects. Mice deficient or not for the GAL-1 gene were treated with streptozotocin (STZ) for the induction of experimental DM1.Both recombinant forms of HLA-G were produced, but only HLA-G6 was characterized as a polydisperse solution containing a major component (99.2%), with molecular mass of 23,603,766 Da, hydrodynamic radius of 6.0 ± 2.0 nm, and immunoreactivity for different commercial or lab produced anti-HLA-G antibodies HLA-G and GAL-1. The transcriptional and protein levels were not different between the groups of subjects studied. High induction of the negative modulator miRNA expression of HLA-G (hsa-miR-16-5p) in the controls compared to the patients was the only robust association found with the pathogenesis of DM1.Interestingly, wild type animals presented more susceptibility to the induction of DM1 by STZ, once the indicators of this disease such as the degree of insulin, the migration rate of CD4 T and CD8 T lymphocytes to pancreatic lymph nodes, the level of insulin reduction in the pancreas and the glycemic rate were increased in wild type mice (Lgals-$1^{+/+}$) when compared to GAL-1-knock out mice (Lgals-$1^{-/-}$). Finally, this set of results suggests that a positive regulation of the expression of HLA-G transcripts may occur in patients with DM1 and that the presence of endogenous GAL-1 may favor the experimental DM1. These data open new perspectives for a better understanding of the immunopathology of DM-1.

Keywords: Type 1 Diabetes *mellitus*, Galectin-1, Human Leukocyte Antigen - G (HLA-G), Immunoregulation.

RESUMEN

Pelá. F. P. **Estudio de las moléculas reguladoras inmunes galectina-1 y el antígeno leucocitario humano-G: la construcción de herramientas e impacto sobre la diabetes autoinmune.** 2017. 122f. Tesis. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Diabetes mellitus tipo 1A (DM1) es una enfermedad crónica que se caracteriza por la destrucción inmune de las células beta del páncreas y la incapacidad del paciente para producir insulina. En las últimas décadas se produjo un aumento en el conocimiento de la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 1 y un aumento significativo en la incidencia global de esta enfermedad. Sin embargo, en la literatura existen preguntas que deben ser respondidas acerca de esta enfermedad que implica aspectos de su etiología y la inmunopatología. Con este fin, las formas recombinantes de HLA-G (-G5 y -G6) y sus respectivos anticuerpos se produjeron y se caracterizaron bioquímicamente. A partir de muestras de pacientes diagnosticados con diabetes tipo 1 y sujetos sanos se realizó un análisis comparativo de los perfiles de expresión de HLA-G y Gal-1 y la identificación de los microARN (miRNA) asociados con estas dos moléculas. Los ratones con o sin déficit de Gal-1 fueron tratados con estreptozotocina (STZ) para inducir DM1 experimental. Las dos formas recombinantes de HLA-G se produjeron, pero sólo el HLA-G6 se caracterizó como una solución polidispersa, que comprende un componente principal (99,2%) con un masa molecular de 23,603.766 Da, radio hidrodinámico de 6,0 ± 2,0 nm e inmunorreactividad para diferentes anticuerpos anti-HLA-G comerciales o producidos en el laboratorio. Los niveles de transcripción y proteínas de HLA-G y LAG-1 no difirieron entre los grupos de individuos estudiados. El análisis comparativo de miRNAs mostró como la única asociación sólida con la patogénesis de la DM1 una alta inducción de los genes miARN moduladores negativos de la expresión de HLA-G (HSA-mir-16-5p) en los sujetos controles al compararse con los pacientes. Curiosamente, animales salvajes fueron más susceptibles a la inducción de la diabetes por STZ tipo 1. Los indicadores de la enfermedad tales como el grado de insulitis, la tasa de migración de células T CD4 + y CD8 para los ganglios linfáticos pancreáticos, la reducción de la insulina del tejido y los niveles de glucosa aumentaron en los animales salvajes al compararse con los animales con déficit de GAL-1. Por último, este conjunto de resultados sugiere que existe un incremento en la expresión de HLA-G. Transcripciones en pacientes con DM1 y la presencia de GAL-1 endógeno pueden promover la DM1 experimental. Estos datos llevan a nuevas perspectivas para una mejor comprensión de la inmunopatología de DM-1.

Palabras llave: Diabetes mellitus tipo 1, Galectina-1, Antígeno Leucocitario Humano - G (HLA-G), Inmunorregulación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O desequilíbrio do sistema imunológico é crucial para o desenvolvimento do DM1. A figura ilustra fatores responsáveis pela regulação da resposta imunológica evidenciando elementos que contribuiem para o aumento da susceptíbilidade ao DM1. O resultado é o descontrole dos mecanismos da tolerância central e periférica que associado a fatores ambientais estimulam o aparecimento desta patologia. Os principais tipos celulares envolvidos na resposta imunológica do DM1 são listados nos tópicos imunidade e regulação e, estão envidos na regulação das citocinas e proteínas. 4

Figura 2: Funções Imunorregulatórias de Gal-1 frente a diferentes leucócitos. 11

Figura 3: Esquema do locus gênico do HLA-G e das suas isoformas proteicas. A tradução do gene do HLA-G promove, por processamento alternativo de RNAm, diferentes isoformas proteicas (-G1 a -G7) com distintas caractarísticas bioquímicas/estruturais como associação ou não (formas solúveis) com a membrana celular, interação não-covalente com a proteína β2-microglobulinas, processamento proteolítico e oligomerização. 14

Figura 4: Estratégia de inserção da proteína SUMO ao vetor de expressão pET28a-c(+). A) Região de clonagem múltipla do vetor pET28a-c(+). B) Representação esquemática da construção do vetor pET28a(+)-SUMO. 20

Figura 5: Obtenção e caracterização da proteína recombinante rhGST-HLA-G5. A) Perfil proteico do processo de obtenção da proteína rhGST_HLA-G5. MM- Marcador de Peso Molecular (kDa) (Lonza). 1) Extrato proteico bacteriano sem transformação com o vetor pGEX-6p2, 2) Extrato proteico bacteriano sem indução IPTG 3) Fração solúvel do extrato proteico bacteriano, sobrenandante, com indução IPTG, 4) Fração insolúvel do extrato proteico bacteriano, botão proteico,com indução IPTG 5) Corpo de Inclusão recuperado e solubilizado com 8mM uréia (64kDa), 6,7 e 8) Amostra ultrafiltrada em amicon cut off 50kDa (64kDa). B) Caracterização imunoquímica da proteína rhGST-HLA-G5 com anticorpor comercial MEM-G1 reativo a cadeia pesada do HLA-G desnaturado. 48

Figura 6: Obtenção da proteína recombinante rhHLA-G6. Perfil proteico do processo de obtenção da proteína rhHLA-G6 MM- Marcador de Peso Molecular (kDa) (Lonza). 1) Extrato proteico bacteriano sem indução IPTG, 2) Extrato proteico bacteriano induzido com IPTG, 3) Sobrenadante do extrato bacteriano induzido, 4) Botão proteico do extrato bacteriano induzido, 5) Corpo de inclusão desnaturado, 6) Proteína His6-tagged SUMO-HLA-G6 eluida de HisTrap FF, 7) rhHLA-G6 purificada. 50

Figura 7: Determinação da massa molecular de rhHLA-G6 por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF.....51

Figura 8: Imunodetecção de rhHLA-G6, nativo ou desnaturado, reativos aos anticorpos comerciais MEM-G1 e MEM-G9. 52

Figura 9: Caracterização da reatividade dos soros imunes anti-HLA-G. A) Ensaio de Western Blotting para detecção das estruturas conformacionais desnaturadas e reativas de HLA-G5 e HLA-G6, B) Ensaio de Slot Blotting para detecção das estruturas conformacionais nativas de HLA-G5 e HLA-G6 quando soros imunes são desafiados aos antígenos recombinantes: 1) fração insolúvel da bactéria Rosetta(DE3)pLYS sem indução com IPTG, 2) fração insolúvel da bactéria Rosetta(DE3)pLYS com indução com IPTG, 3) fração solúvel rhGST_HLA-G5, 4) fração insolúvel rhGST_HLA-G6 e 5) fração solúvel de HLA-G5. 53

Figura 10: Caracterização da reatividade dos anticorpos IgY anti-HLA-G e IgY anti-Gal-1. A) Ensaio de Slot Blotting para detecção das estruturas conformacionais nativas de HLA-G5 e HLA-G6 quando soros imunes são desafiados aos antígenos recombinantes: 1) fração insolúvel da bactéria Rosetta(DE3)pLYS sem indução com IPTG, 2) fração insolúvel da bactéria Rosetta(DE3)pLYS com indução com IPTG, 3) fração solúvel rhGST_HLA-G5, 4) fração insolúvel rhGST_HLA-G6 e 5) fração solúvel de HLA-G5. B) Ensaio de Western Blotting para detecção das estruturas conformacionais desnaturadas e reativas de Ga-1. 54

Figura 11: Caracterização da reatividade dos anticorpos monoclonais anti-HLA-G5. A) Ensaio de imunodetecção por ELISA indireto seguido do teste estatístico One-Way Anova para identificação dos potenciais hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-HLA-G5. B) Expansão da cultura celular do hibridoma 4H12 após 15 dias de seleção em meio HAT observado em microscopia de contraste de fase em objetiva 40X. C) Ensaio de Slot Blotting para avaliação da reatividade do pool de alíquotas do sobrenadante de cultura dos hibridomas 4H12 e 3F6 nas amostras 1) extrato bacteriano de Rosetta(DE3)pLYS sem indução ao IPTG 2) extrato bacteriano de Rosetta(DE3)pLYS expressando rhGST-HLA-G5 3) rhGST-HLA-G5 4) rhGST-HLA-G6 e 5) rhHLA-G5.....55

Figura 12: Perfil da expressão relativa dos transcritos gênicos HLA-G (A) e LGALS-1 (B). Representação da Expressão Relativa representativo da média dos valores de 2-ΔΔCt. (Valores de expressão relativa expressos como fold change em relação aos valores do grupo controle de valor 1). O teste de Mann Whitney foi aplicado.....56

Figura 13: Análise comparativa entre os miRNAs identificados pelo sequenciamento de nova geração (NGS) no contexto biológico do DM1 e os miRNAs preditos e/ou validados para os transcritos gênicos de HLA-G, LGALS-1, comuns a ambos e validados para o DM1 nos bancos de dados. A) Identificação de 1021 miRNAs alvos para o HLA-G. B) Identificação de 886 miRNAs alvos para o LGALS-1. C) Identificação de 21 miRNAs alvos comuns para o HLA-G e LGALS-1. D) Ausência de identificação para o DM1.....57

Figura 14: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para o transcrito HLA-G contexto do DM1. Neste heatmap a restringência estatística foi estabelecida por pvalue < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de Pearson. 59

Figura 15: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para o transcrito LGALS-1 no contexto do DM1. Neste heatmap a restringência estatística

foi estabelecida por pvalue < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de Pearson. 63

Figura 16: Agrupamento Hierárquico dos miRNAs reguladores para os transcritos HLA-G e LGALS-1 no contexto do DM1. Neste heatmap a restringência estatística foi estabelecida por pvalue < 0,01 na análise da distância métrica da correlação de Pearson. 66

Figura 17: Níveis proteicos de HLA-G (A) e GAL-1 (B) em plasma de pacientes DM1 e indivíduos controles. 67

Figura 18: Galectina-1 endógena favorece o desencadeamento do DM1 induzido quimicamente. A) Taxa de incidência do DM1 nos animais selvagens (Lgals-1+/+) e nocautes para GAL-1 (Lgals-1-/-) tratados com STZ (40mg/Kg do animal). B) Registro do nível glicêmico dos animais não tratados no 0, 7° e 15°dia; C) Nível glicêmico dos animais não tratados no 15° dia; D) Registro do nível glicêmico dos animais tratados no 0, 7° e 15°dia; E) Nível glicêmico dos animais tratados no 15° dia. O STZ foi diluído em tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4.5) o qual foi indicado como veículo (V). 69

Figura 19: Análise da insulite e da taxa de produção insulina no pâncreas de animais tratados ou não com STZ. A) Análise histopatológica de tecido pancreático de animais selvagens (Lgals-1+/+) ou nocautes para o gene da GAL-1 tratados ou não com STZ. A detecção de insulina pancreática foi feita com anticorpo anti-insulina como descrito na seção de materiais e métodos. B) Análise semi-quantitativa da presença ou ausência de insulite nas ilhotas pancreáticas dos animais ensaiados. Ausência de insulite foi indicada por zero, a presença de leucócitos ao redor das ilhotas com o valor um e a presença de leucóticos no interior das ilhotas com o valor 2. 71

Figura 20: Perfil imunofenotípico de células dos linfonodos pancreáticos de animais deficientes ou não de galectina-1, no modelo do DM1. Os leucócitos dos linfonodos pancreáticos foram isolados e submetidos à marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3, antiCD-4 e ant-CD8, como indicado na seção de materiais e métodos. A imunofenotipagem foi realizada com auxílio de um citometro de fluxo (FACSCanto II - BDBioscience, New Jersey, EUA) e do software BD FACSCANTO CLINICAL (BDBioscience, New Jersey, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de positividade para os marcadores que caracterizam os leucócitos em linfócitos T CD4 ou T CD8. 72

Figura 21: Translocação bacteriana do ambiente gastro-intestinal para os linfonodos pancreáticos nos animais submetidos ao DM1 experimental. Amostras de suspensões celulares dos linfonodos pancreáticos dos animais selvagens (Lgasl-1+/+) ou nocautes (Lgasl-1-/-) previamente tratados com STZ ou tampão citrato de sódio (0.01M - pH 4,5 – veículo, V) foram transferidas para o meio ágar BHI e incubadas por 48 horas a 37°C para determinação de suas cargas bacterianas. A quantificação desta carga foi feita pela determinação de Unidades Formadoras de Colônias por mL (CFU/mL).....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de primers desenhados para estratégia de clonagem em sítios de restrição BamHI e XhoI. 21

Tabela 2: Sequências peptídicas resultantes da análise dos digestos trípticos em espectrometria de massas LC-ESI-Q-TOF-MS / MS.....47

Tabela 3: Lista dos digestos trípticos resultantes da caracterização da proteína His6-tagged SUMO-HLA-G6. 49

Tabela 4: Análise do estado estrutural da proteína rhHLA-G6 em ensaio de dinâmica de dispersão de luz. 50

Tabela 5: Identificação dos miRNAs alvos para HLA-G comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados conforme método de contagem de reads pvalue<0,01. 58

Tabela 6: Identificação dos miRNAs alvos para LGALS-1 comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados conforme método de contagem de reads, pvalue<0,01. 61

Tabela 7: Identificação dos miRNAs alvos comuns para HLA-G e LGALS-1 comuns aos miRNAs sequenciados e aos miRNAs validados e preditos nos bancos de dados. 64

Tabela 8: Análise da informação genética de HLA-G e LGALS-1 no DM1. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - grau Celsius

µg – micrograma

µL – microlitro

µm – micromolar

3'-UTR - *3'*- não traduzida

5' UTR – 5' não traduzida

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

ADA – Associação Americana de Diabetes

CD - Células dendríticas

CRD – Dominío de Reconhecimento de Carboidrato

CTLA4 - Antígeno 4 Associado com Linfócito T Citotóxico

CPS-hUCMS - Sangue de Cordão Umbilical envolvidas em microcápsulas imunes

DC-Gal-1 - Células dendríticas transgênicas para o gene da Gal-1

DM - Diabetes *mellitus*

DM1-1A- Diabetes *mellitus tipo 1* A

DM1-1B - Diabetes *mellitus tipo 1* B

DM2- Diabetes *mellitus* tipo 2

GAD-65- Ácido glutâmico decarboxilase

Gal-1 - Galectina-1

GWAS- Estudos de associação genômica

HLA-G - Antígeno Leucocitário Humano – G

IA-2 - Insulinoma associada

IDDM1- *loci* Diabetes mellitus insulino-dependente 1

IDDM2 – *loci* Diabetes mellitus insulino-dependente 2

IFIH1 - Interferon induzido com o domínio C da helicase 1

IGF2 - Fator de crescimento semelhante à insulina II

INS- Insulina

IFN-γ - Interferon γ

IL-1β - Interleucina-1β

IL-2 - Interleucina-2

IL2RA - Receptor de Interleucina 2, alfa

IPTG- Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosideo

ITIM - Motivos intracelulares inibitórios

LADA - Diabetes autoimune latente de adulto

LGALS-1 - Ligação de galactósido de Lectina, solúvel, 1

LIR-1/ILT2 - receptores de leucócitos tipo imunoglobulina 1

LIR-2/ILT4 - receptores de leucócitos tipo imunoglobulina *2* ou ILT4

Mody - Diabetes da maturidade com início no jovem

MHC – Complexo Principal da Histocompatibilidade

NK- Células exterminadoras naturais

NOD – Diabético não obeso

PTPN22 - Proteína Tirosina Fosfatase não Receptora Tipo 22

ST3Gal1 - Glicosilação α2-3 sialiltransferases

SUS - Sistema Único de Saúde Brasileiro

SNP – Polimorfismo de base única

Treg - Células T regulatórias

TH - Tirosina Hidrolase

TNF-α - Fator de necrose tumoral

VNTR-INS - Número variável de cópias em *tandem* – insulina

ZnT8 - *Zinc transporter 8*

gL: LINE-1 Retrotransposon no promotor HLA-G

LCR: *Locus* de controle

CRE: Elemento de resposta do cAMP

RRE: Elemento de resposta do Ras

ISRE: Elemento de resposta estimulados por interferon

GAS: Sítio ativado por interferon-gama

HSE: Elemento de resposta ao choque térmico

HRE: Elemento de resposta a hipóxia

PRE: Elemento de resposta a progesterona

Enhancer A: Sitios de ligação NF-B acoplados a ISRE

SUMÁRIO

RESUMO ix
ABSTRACT x
RESUMEN xi
LISTA DE FIGURAS xii
LISTA DE TABELAS xv
LISTA DE ABREVIATURAS xvi
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Aspectos gerais do diabetes mellitus 1
1.2. Diabetes mellitus tipo 1: uma doença autoimune. 3
1.3. Galectina-1: Estrutura e Funções. 9
1.4. Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G): Estrutura e Funções. 12
1.5. As moléculas imunorregulatórias (HLA-G e Galectina-1) e a doença autoimune DM1. 15
2. OBJETIVOS 18
2.1. Geral 18
2.2. Específicos 18
3. MATERIAIS E MÉTODOS 19
3.1. Desenvolvimento de ferramentas técnico-científicas: Proteínas Recombinantes e Anticorpos 19
3.1.1. Produção de proteínas recombinantes HLA-G5 e HLA-G6 19
3.1.2. Clonagem Molecular 19
3.1.2.1. Vetor de clonagem 19
3.1.3. Expressão proteica de HLA-G5 e HLA-G6 em sistema procarioto 22
3.1.4. Isolamento e solubilização dos corpos de inclusão. 24
3.1.5. Purificação e refolding da proteína recombinante rhHLA-G6. 26
3.1.6. Caracterização Bioquímica e Imunoquímicas das proteínas recombinantes humanas HLA-G5 e HLA-G6. 27
3.2. Produção de anticorpos anti-HLA-G e anti-GAL-1 31
3.2.1. Animais 31
3.2.2. Obtenção de soro imune anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6. 31
3.2.3. Obtenção de anticorpos monoclonais anti-HLA-G5 e anti-HLA-G6. 32
3.2.4. Obtenção de anticorpos policlonais IgY anti-HLA-G5, anti-HLA-G6 e anti-GAL-1. 33
3.2.5. Ensaios de Imunodetecção para validação da reatividade dos anticorpos... 34
3.3. Detecção do perfil de expressão de GAL-1 e HLA-G em pacientes DM-1. .. 36

3.3.1. Casuística e População de Estudo 36
3.3.2. Síntese de cDNA (DNA Complementar).....36
3.3.3. Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativa (Real Time – PCR). 37
3.3.4. Sequenciamento de Nova Geração dos miRNAs 39
3.3.5. Análise in silico de identificação dos miRNAs alvos para LGALS-1 e HLA-G. 39
3.3.6. Quantificação proteica de HLA-G e GAL-1 pelo método de ELISA. 40
3.4. Análise do efeito imunorregulatório de GAL-1 e HLA-G em modelo experimental induzido quimicamente ao DM1. 41
3.4.1. Animais 41
3.4.2. Indução química por estreptozotocina (STZ) ao diabetes mellitus tipo 1 experimental. 41
3.4.3. Imunofenotipagem das células dos linfonodos pancreáticos. 42
3.4.4. Análise Histoquímica e Imunohistoquímica 43
3.4.5. Detecção de translocação bacteriana para os linfonodos pancreáticos. 44
3.5. Análise Estatística 44
4. RESULTADOS 46
4.1. Desenvolvimento de ferramentas experimentais 46
4.1.1. Obtenção da proteína recombinante rhGST-HLA-G5 46
4.1.2. Obtenção da proteína recombinante rhHLA-G6 48
4.1.1. Obtenção de anticorpos reativos às proteínas HLA-G.....52
4.1. Detecção do perfil de expressão de GAL-1 e HLA-G em pacientes diagnosticados com DM-1. 55
4.1.1. Perfil de expressão gênica de HLA-G e LGALS-1 no DM1 analisada por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). 55
4.1.1. Identificação, in silico, de miRNAs para LGALS-1 e HLA-G e associados ao DM1 a partir dos miRNAS sequenciados de pacientes e indivíduos controles. 56
4.1.1. Quantificação proteica de HLA-G e GAL-1 pelo método de ELISA. 67
4.1.1. Análise comparativa, parcial e preliminar, dos padrões de expressão das moléculas HLA-G e LGALS-1 no DM1 humano. 67
4.1. GAL-1 e HLA-G no modelo experimental do DM1. 68
4.1.1. Impacto da deficiência do gene da Gal-1 na evolução do DM-1 experimental. 68
4.1.1. Análise histoquímica do pâncreas de animais tratados ou não com STZ.....70
4.1.1. Identificação dos tipos celulares presentes nos linfonodos pancreáticos. 71
4.1.2. Análise da ocorrência da translocação bacteriana no desencademanto do DM1. 72

5. DISCUSSÃO 74
6. CONCLUSÃO 82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83
ANEXOS 99
ANEXO 01: Documento de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 99
ANEXO 02: Documento de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.....100
ANEXO 03: Predição da estrutura complexa do rhHLA-Gproteína-proteína por rearranjo multimérico a partir da sequência da proteína recombinante.....101

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas caracterizado pela hiperglicemia resultante da falha no processo de secreção da insulina e/ou falha na atividade funcional da insulina cujas causas estão associadas ao comprometimento da síntese desta proteína pelas células β pancreáticas ou pela destruição de células β pancreáticas por imunomediação (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; RICCI *et al.*, 2017).

O DM é tido como uma epidemia em pleno curso o qual, em 2014, acometia, mundialmente, 422 milhões de indivíduos, com estimativa de 471 milhões em 2035. No Brasil, em 2014, a estimativa foi de 11,9 milhões de indivíduos diabéticos, com estimativa de 19,2 milhões, em 2035 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015-2016, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Os avanços decorridos da última década no conhecimento da patogenia, epidemiologia, heterogeneidade, marcadores preditivos, proposição de terapêuticas, dentre outros, favoreceram a busca da padronização do diagnóstico da doença bem como a melhor classificação mesma (ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014).

De modo geral, o DM pode ser diagnosticado com base nos critérios do nível de glicose plasmática, em que, o teste de glicemia casual ≥ 200 mg/dλ; glicemia de jejum ≥ 126 mg/dλ (7 mmol/λ); glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dλ e critérios de hemoglobina glicada A1c ≥ 6.5% (48 mmol/mol) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015-2016, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Segundo *American Diabetes Association* (ADA), 2016, as classificações estabelecidas para o DM1 são da ordem imuno-associadas: tipo 1A; e, idiopáticas: tipo 1 B, Diabetes do Adulto de Início no Jovem (*Maturity-Onset Diabetes of the Young* - Mody); e Diabetes Auto-Imune Latente do Adulto (*Latent autoimmune diabetes of adult* - LADA). Quanto às classificações idiopáticas essas podem ser resultantes de: alterações genéticas as células β pancreáticas e da ação da insulina, processos de doenças que danificam o pâncreas, diabetes relacionado a outras

endocrinopatias e os casos decorrentes do uso de medicamentos (GROSS *et al*., 2002, ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

O Diabetes *mellitus tipo 1* A define-se por ser doença crônica autoimune de caráter multifatorial caracterizada pelo comprometimento da produção de insulina endógena pelas células β pancreáticas em decorrência da destruição das mesmas dado à imunomediação desencadeada por células T auto reativas responsáveis pelo processo de infiltração das ilhotas pancreáticas (EISENBARTH, 1986, EISENBARTH & JEFFREY, 2008; WU *et al.,* 2013, ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

As causas do Diabetes *mellitus tipo 1* B são múltiplas e ainda não completamente elucidadas, mas se correlacionam com anormalidades metabólicas associadas a mutação de receptores de insulina, resultando na redução da secreção de insulina pelas células β pancreáticas com consequente hiperinsulinemia a hiperglicemia modesta conforme a severidade do diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004; DIB, 2008, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

O diabetes tipo *Mody* caracteriza-se pelo caráter genético da doença, em que a transmissão autossômico-dominante de pelo menos um dos seguintes genes *HNF-4α, GCK, HNF-1α, IPF-1, HNF-1β, NEUROD*, desencadeia diferentes modulações da secreção de insulina. Desta forma, o *Mody* é classificado como diabetes familiar, cujo diagnóstico é feito precocemente (infância, adolescência ou adultos jovens) (OLIVEIRA, FURUZAWA & REIS, 2002; CORREIA *et al,* 2011, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

O diabetes do tipo *Lada* define-se por ser uma doença incidente em adultos, característica típica do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), associada a fatores metabólicos, genéticos e imunológicos típicos do DM1, os quais desencadeiam a autoimunidade decorrente da presença de auto-antígenos nas ilhotas pancreáticas. Pode progredir na falência das células pancreáticas e a sucessiva dependência de insulina exógena (ZIMMET, P. *et al.,*1994; LESLIE D. & VALERI C., 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004, FOURLANOS S., *et al* 2005; STRENSTRÖM G.*et al,* 2005, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

As manifestações clínicas iniciais do DM1 tais como, polidipsia, polifagia e poliúria, associadas à hiperglicemia, favorecem o rastreamento geográfico da

incidência da doença no âmbito mundial, evidenciando a variabilidade do mesmo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004, ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015). Cita-se como exemplo, apresentando taxas por 100 mil indivíduos com menos de 15 anos de idade, a Finlândia com >60, Sardenha com ~40, Brasil com 7,6, China, Índia e Venezuela com 0,1 e Coréia com 0,5 (EKOÉ, 2008, ATKINSON, EISENBARTH & MICHELS, 2014, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

Dado a variabilidade da incidência, particularmente, com as perspectivas de aumento da indicidência do DM, associada à carga da doença, ou seja, o impacto da mortalidade cuja estimativa é de 1,5 milhões de mortes diretamente associadas ao DM e, 2,2 milhões de mortes atribuídas ao alto nível de glicose; e dos problemas de saúde tais como nefropatias, retinopatias, neuropatias, lesões cardíacas e hipertensão, obesidade, dentre outras, que são classificadas como doenças secundárias ao DM, que afetam a qualidade de vida de seus portadores, se faz necessário medidas eficazes de saúde pública aliada aos incentivos à pesquisa e a tecnologia para desenvolvimento de diretrizes e terapêuticas a um melhor custo benefício (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014, KNOWLER *et al.,* 2009, IBGE, 2014).

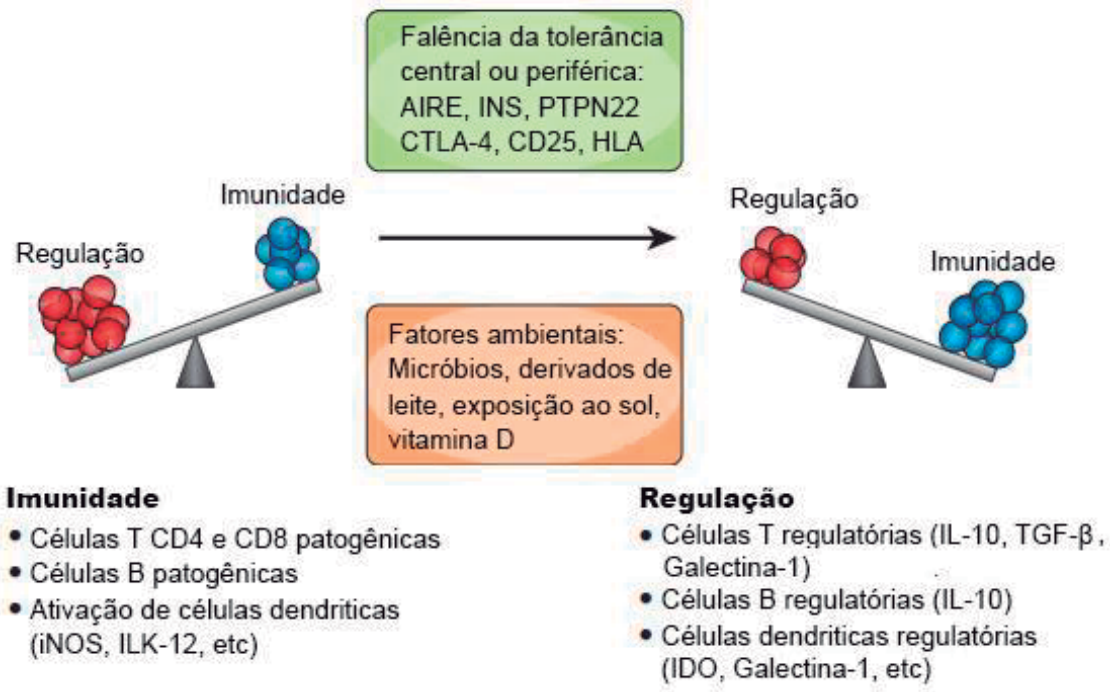
Os gastos públicos diretos com DM variam entre 2,5% e 15% do orçamento anual da saúde de um país. Como exemplo, o Brasil, cujo Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS) tem o dispêndio da ordem de US$2.108,00 por paciente, o que evidencia a necessidade do planejamento e alocação de recursos de modo racional (ALBERTI, 1999; IBGE, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

1.2. Diabetes *mellitus* tipo 1: uma doença autoimune.

Representa a segunda maior causa de diabetes *mellitus* (DM) cuja incidência acomete 5-10% dos indivíduos portadores dessa desordem metabólica (HALIMI & BENHAMOU, 2004) de um total de 387 milhões de pacientes em todo o mundo. No Brasil, há cerca de 19,2 milhões de pacientes diagnosticados com DM (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2011).

Apesar dos progressos consideráveis na compreensão dos fatores genéticos de susceptibilidade e do mecanismo da autoimunidade que precedem o aparecimento clínico do DM1, a origem da autoimune, em si, apresenta lacunas a serem respondidas, dentre elas, a atividade de moléculas imunorregulatórias, principalmente, de padrão anti-inflamatório, no contrapeso do exacerbado padrão inflamatório desencadeado no processo etiológico da doença (SCHRANZ & LERNMARK, 1998). Bluestone e colaboradores, 2010, descrevem o desequilíbrio do sistema imune desencadeado por exposição de fatores externos em associação ao efeito genético predisposto no indivíduo durante o desenvolvimento desta patologia (Figura 1).

Figura 1: O desequilíbrio do sistema imunológico é crucial para o desenvolvimento do DM1. A figura ilustra fatores responsáveis pela regulação da resposta imunológica evidenciando elementos que contribuiem para o aumento da susceptíbilidade ao DM1. O resultado é o descontrole dos mecanismos da tolerância central e periférica que associado a fatores ambientais estimulam o aparecimento desta patologia. Os principais tipos celulares envolvidos na resposta imunológica do DM1 são listados nos tópicos imunidade e regulação e, estão envidos na regulação das citocinas e proteínas.



Fonte: Adaptado de Bluestone *et al.*, 2010 e Arthur *et al.,* 2015.

Ao que concerne aos fatores genéticos, 18 regiões genômicas já foram descritas e associadas ao risco de susceptibilidade ao DM1. Essas regiões gênicas denominadas de IDDM, IDDM1 a IDDM18, são responsáveis por promoverem alterações na codificação e no nível da expressão das respectivas proteínas (SCHRANZ & LERNMARK, 1998, MAAHS, 2010).

Dentre as regiões mais evidenciadas, estão os genes de *HLA*, localizados na região cromossômica 6p21, "Insulin dependent diabetes mellitus 1" (IDDM1), responsáveis por codificar proteínas efetoras da resposta imune, as proteínas do complexo principal de imunohistocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC). Atualmente, sabe-se que genótipos do *HLA* estão relacionados à susceptibilidade, dentre eles: DQA1*0501–DQB1*0201/DQA1*0301–DQB1*0302 e DRB1*03/DRB1*04, os quais promovem alterações no resíduo de aminoácido na posição 57 da cadeia β e na posição 52 da cadeia α, afetando assim o reconhecimento e a apresentação de antígenos para as células T CD4, elevando para 40% o risco de desenvolvimento do DM1. Em contrapartida, também está descrito genótipo que contribui na proteção ao DM1, o DQA1*0102–DQB1*0602–DRB1*1501 (FAUSTMAN, 1993, FAUSTMAN, 1993, SCHRANZ & LERNMARK, 1998, BLUESTONE, HEROLD & EINSENBARTH, 2010, HEROLD *et al.,* 2013) .

São descritas mutações na região cromossômica 11p15.5, IDDM2, composta pelos genes, tirosina hidrolase (*TH*), número variável de cópias em *tandem* – insulina (*VNTR-INS*) e fator de crescimento semelhante à insulina II (*IGF2*), compreendendo o *locus* insulina (*INS)*. A principal descrição quanto aos polimorfismos presentes neste *locus* remete aos efeitos transcricionais quanto ao nível de expressão gênica da insulina. O alelo de classe III do *VNTR-INS* possui efeito protetor ao DM1, pois mantem o nível de expressão de insulina, enquanto, o alelo de classe I confere efeito de susceptibilidade o qual contribui com 10% no risco ao DM1, pois reduz o nível de expressão de insulina (BENNET *et al*., 1996, PUGLIESE *et al*., 1997, SCHRANZ & LERNMARK, 1998, ANJOS *et al*., 2004, NEPOM & BUCKNER, 2012).

Estudos do genoma completo (*GWAS- Genome wide association studies*) descrevem a influência de outros genes de susceptibilidade ao DM1, os quais em associação são tidos como fatores de risco ao desencadeamento da doença

(MAAHS *et al.,* 2010, STECK & REWERS, 2011, NEPOM & BUCKNER, 2012).. Dentre eles citam-se o *AIRE (Autoimmune Regulator Factor*) cuja regulação negativa do transcrito gênico altera o mecanismo de tolerância periférica reduzindo a garantia da seleção negativa de clones de células T autoreativas, favorecendo assim, a maturação de células hiperreativas (GEENEN *et al.,* 2012, OLIVERIA *et al.,*2013, MITRE *et al*., 2016)*, o CTLA4* (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4)* cuja mutação afeta a interação do receptor CD28 expresso em células T ativadas (ANJOS *et al.*, 2004, LING *et al*., 2001, UEDA *et al.*, 2003), o *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) cuja mutação provoca uma única substituição da arginina pelo triptofano na proteína codificada, conduzindo a uma diminuição no receptor das células T e na sinalização dos receptores das células B, o que pode resultar num estabelecimento desequilibrado de tolerância tanto em células T como em células B (SHARP *et* al., 2015, ABDELRAHMAN *et* al., 2016, GOMES *et al*., 2017), o *IL2RA* (*interleukin 2 receptor, alpha*) cuja mutação de base única T/A (rs11594656) afeta a expressão do receptor em células T regulatórias o que reduz a atividade supressora de destas a autoantígenos, aloantígenos, antígenos tumorais e antigenos derivados de patogenos. (CHISTIAKOV *et al*., 2008, ABDELRAHMAN *et* al., 2016).

O perfil transcricional dos genes envolvidos na suceptibilidade ou proteção ao DM1 pode ser controlado pela regulação negativa via micro RNAs (miRNAs), os quais inibem a tradução do RNAm por pareamento às sequências nucleotídicas presentes, predominantemente, na 3'UTR (SEBASTIANI *et al*., 2011). Dentre os miRNAs que favorecem o desencademanto do DM1 seus alvos, em geral, são genes relacionados à autoimunidade e as células β pancreáticas, como o miRNA-181a que regula negativamente o transcrito *SMAD7* interferindo na função das células β pancreáticas (NABIH & ANDRAWES, 2016). O mir-26a é descrito como repressor da expressão da histona metiltransferase *EZH2* e *FOXP3*, consequentemente, reduzindo o número de células Treg virgens ativadas (ZHANG *et al*., 2016). Ainda, foram identificados os mir-375, miR-21, miR-24.1, miR-30d, miR-34a, miR-126, miR-146 e miR-148a em pacientes DM1 quando comparados aos indivíduos controles. Esses foram correlacionados à função das células β, resistência à insulina dentre outros parâmetros do DM1 (SEYHAN *et al*., 2016).

Seguindo os estágios do desenvolvimento do DM1, os eventos que precedem a desordem metabólica e o processo autoimune remetem aos fatores ambientais os quais influenciam no desencadeamento da doença: *i*) ocorrência de sazonalidade tanto para meses de nascimento quanto para os diagnósticos do DM1, sendo os meses de nascimento de abril a julho os mais relatados entre pacientes diagnosticados cuja hipótese explicativa remete aos níveis de variação de vitamina D materna os quais promovem efeito nas células β pancreáticas e células imunológicas (JONGBLOET *et al.,* 1998, MCKINNEY, 2001, VAISERMAN *et al.,* 2007, KAHN *et al,* 2009); *ii*) exposição precoce insuficiente aos microorganismos reduz a regulação do sistema imune ao processo de maturação de células T, o que proporcionaria maior risco ao DM1 (PUNDZIUTE-LYCKA *et al*, 2000); *iii*) exposição a infecções virais como, por exemplo, *coxsackie B1* (LAITINEM *et al.,* 2014), enterovírus (BERGAMIN *et al.,* 2015, RODRIGUEZ-CALVO, 2015); *iv*) fatores nutricionais como a inserção precoce na dieta infantil de alimentos derivados do leite de vaca (NORRIS *et al.,* 1996, VIRTANEN *et al.,* 1998).

As evidências das anormalidades imunológicas remetem à detecção de autoanticorpos reativos a diferentes antígenos que podem iniciar o processo de insulite como ao *Zinc transporter 8* (ZnT8), a insulina, a ácido glutâmico decarboxilase (GAD65) e ao insulinoma associada (IA-2) (EISENBARTH & JEFFREY, 2008, PIETROPAOLO *et al.,*2012, ATKINSON *et al*, 2014, MORRAN *et al.,* 2015). Diferentes estudos descrevem que apesar de ocorrer majoritariamente o processo inflamatório, o mesmo, não ocorre de maneira uniforme, pois no pâncreas podem coexistir ilhotas normais, ilhotas pseudoatrofiadas as quais não sofrem insulite e, ilhotas com insulite, o que resultará no desenvolvimento temporal crônico da doença (FOULIS, MCGIL & FARQUHARSON, 1991, BUTLER *et al.,* 2007).

Delineia-se o início da patogênese do DM1 com o processamento e apresentação de autoantígenos de células β pancreáticas por células apresentadoras de antígeno (APCs) para linfócitos T autoreativos do tipo CD4 e CD8. Dados na literatura evidenciam que tal mecanismo de apresentação às APCs de células β pancreáticas pode, também, ter origem em um processo de infecção viral (BLUESTONE, HEROLD & EINSENBARTH, 2010, ATKINSON *et al.,* 2014).

A apresentação de auto-antígenos e a co-estimulação das APCs promovem a proliferação e diferenciação de linfócitos T CD4 em linfócitos T $CD4^+$efetoras autoreativas, as quais tendem a potencializar sua expansão e função com ação de células derivadas do complemento, C3a e C5a, as quais são ativadas durante a interação célula T – APCs (CABRERA *et al.,* 2012).

As células T efetoras autoimunes que infiltram nas ilhotas pancreáticas secretam citocinas associadas ao padrão de resposta imune do tipo Th1, como interferon γ (IFN-γ) e interleucina-2 (IL-2). Estas citocinas próinflamatórias auxiliam no recrutamento de macrófagos e linfócitos T $CD8^+$, consequentemente, desencadeando o processo denominado de insulite. Ainda, a secreção de quimiocinas favorece a exacerbação do recrutamento de células mononucleares e, consequente, *loop* positivo para destruição das células β pancreáticas (BLUESTONE, HEROLD & EINSENBARTH, 2010).

A morte das células β pancreáticas é resultado direto da ação das perfurinas/granzinas mediada por células T $CD8^+$ e da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IFN-γ, fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina-1β (IL-1β) (CAO *et al.,* 2007). Estudos têm demonstrado a relevância de células T regulatórias (Treg) na patogênese do DM1, particularmente, devido à alta afinidade por autoantígenos contribuindo assim para supressão das células Th1 efetoras por mecanismos dependentes da secreção de citocinas IL-10 e TGF-β (ASSEMAN *et al,* 1999, FALHEN *et al.,* 2005, MARIE *et al.,* 2005, CABRERA *et al.*, 2012).

No entanto, no contexto do DM1, a função regulatória das células Treg esta comprometida e isto favorece a resposta pró-inflamatória exacerbada das células T efetoras autoreativas. Desta forma, há uma incapacidade de manter a autotolerância, o que favorece a resposta pró-inflamatória mediada por células com padrão de resposta imune Th1 e, consequente destruição das células β (BLUESTONE, HEROLD & EINSENBARTH, 2010, CABRERA *et al.,* 2012).

Dentre as teorias propostas para justificar a prejudicada função de Treg está a ineficaz sinalização de IL-2 / IL-2R a qual confere redução ao estímulo de Treg, consequentemente, exacerbando a proliferação das células T efetoras e possível prejuízo à sinalização das células dendríticas (CD) (FURTADO *et al.,* 2002, MALEK, 2008, TANG *et al.,* 2008). Ainda, descreve-se o efeito prejudicado da apresentação

das CD imaturas ou defeituosas às células $CD8^+$Tregs na patogenia do DM1 em decorrência do defeito de reconhecimento proteína de choque térmico Hsp60sp pela molécula de MHC de classe II, o HLA-E, cuja interação é necessária para ativação das células T $CD8^+$ (YAMAZAKI *et al.*, 2003, VUCKOVIC *et al.,* 2007). Vários leucócitos estão envolvidos na imunopatologia do diabetes tipo 1, sendo os linfócitos T CD4 e CD8 autorreativos críticos no desenvolvimento desta doença promovendo a destruição das células β presentes nas ilhotas pancreáticas (HASKINS & McDUFFIE, 1990, PETERSON & HASKINS, 1996, MILLER *et al.,* 1988, BAYRY *et al.,*2016, BLUESTONE *et al.,* 2015).

1.3. Galectina-1: Estrutura e Funções.

A galectina-1 (Gal-1) pertence a uma família de proteínas que se ligam de modo específico as glicanas, "*Glycan-binding proteins*", encontradas nos animais. Esta família de proteínas é composta por 15 membros e as duas características estruturais que permitem seu agrupamento são a conservação de resíduos de aminoácidos no domínio de reconhecimento de carboidratos (*Carbohydrate recognition domain - CRD*) e a afinidade por β-galactosídeos. Estas proteínas são multifuncionais e apresentam atividades intra e extracelulares (BARONDES *et al.,* 1994, HUGHES, 1997, BARONDES *et al.,* 2004, STOWEEL & CUMMINGS, 2014, ARTHUR *et al.,* 2015).

A Gal-1 é uma proteína ácida constituída por N-terminal acetilado, ausência de peptídeo sinal, presença de resíduos de cisteínas livres e massa molecular aparente de aproximadamente 15 kDa. A Gal-1 pode formar homodímeros, associados de modo não-covalente, apresentado uma constantes de associação entre 1,25 a 7,0 μM em função de sua origem animal (CHO & CUMMINGS, 1995, COOPER & BARONDES, 1999, LOPEZ-LUCENDO *et al*., 2004, RUBINSTEIN *et al*., 2004, CAMBY *et al.*, 2006, CHIANG *et al.,* 2008). A formação de homodímeros não-covalentes classifica a Gal-1 como prototípica na família das galectinas (CHO & CUMMINGS, 1995; COOPER & BARONDES, 1999; RUBINSTEIN *et al*., 2004; CAMBY *et al.*, 2006; CHIANG *et al.,* 2008). Dados da literatura sobre a estrutura da Gal-1 mostraram que a sua topologia molecular é do tipo *jelly-roll* (LOPEZ-LUCENDO *et al*., 2004).

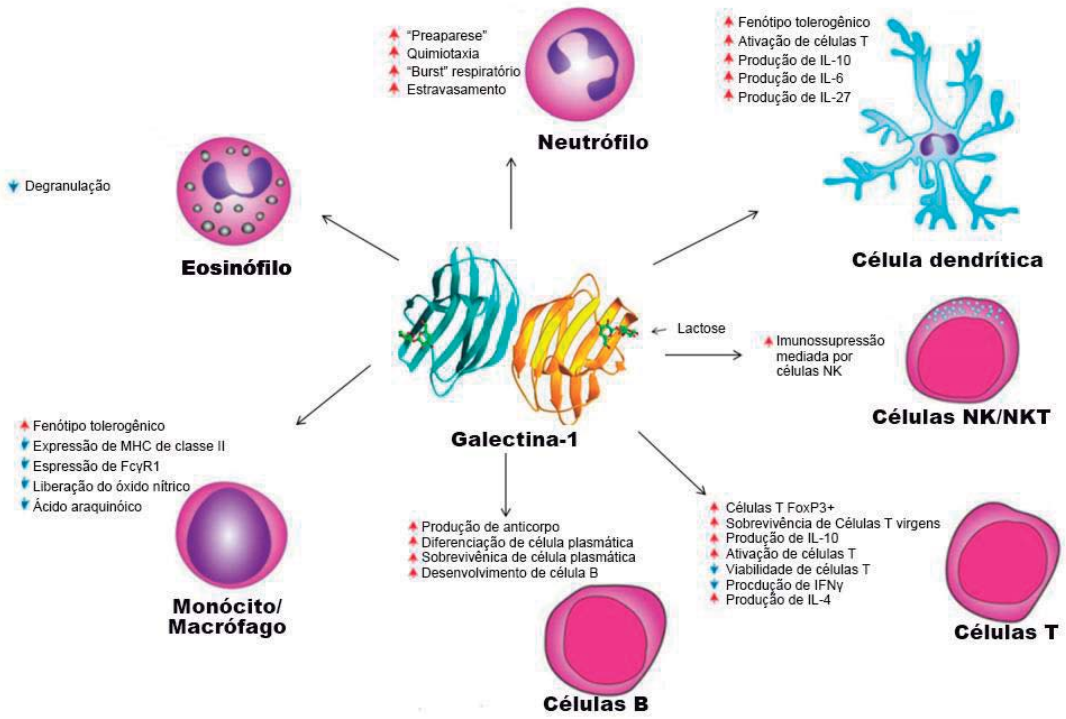
O gene da galectina-1 humana é denominado por *Lectin galactoside-binding, soluble, 1 - LGALS1*, localizado no cromossomo 22q12, constituído por 4 éxons e 3 íntrons, o qual totaliza 4397pb, altamente conservado e, com poucas descrições de polimorfismos, atualmente, apenas 14 SNPs e 2 variações gênicas distribuídos na região 5'UTR (8), em regiões intrônicas (4) e na região 3'UTR (4). Portanto, a prevalência dos SNPs na região 5'UTR delineia maior variabilidade à quantidade dos transcritos a serem codificados (CHIARIOTTI *et al.*, 2004, IIDA *et al,* 2005). Enquanto, em camundongos, o gene da galectina-1 é denoninado *Lgals-1*, localizado no cromossomo 15, constituído por 4 éxons e 3 íntrons, o qual totaliza 3741 pb. As sequências de aminoácidos entre as duas proteínas mostra uma identidade de 88,15% de homologia com a sequência gênica humana (WILSON *et al.*, 1989). Poucos miRNAs foram descritos como tendo alvo a GAL-1, White e colaboradores (2014) identificaram o mir-22 como um regulador negativo da expressão do RNAm de LGALS-1, fato que desfavorece a progressão e metátase de tumor renal.

A Gal-1 é expressa constitutivamente em diversos tecidos como baço, músculos, cérebro, fígado, rins, pele, endométrio, pulmão, estômago, intestino e outros (CAMBY *et al.,* 2006, DIAS BARUFFI *et al.*, 2010). Esta proteína ligante de glicanas apresenta a capacidade de regular uma variedade de processos biológicos, incluindo a homeostase da célula T, a resolução de respostas inflamatórias (RABINOVICH *et al.* 1999, 2002), interações hospedeiro-patógeno (ZUNIGA *et al.* 2001), eliminação seletiva de timócitos específicos durante o desenvolvimento de células T (PERILLO *et al*. 1997, SOTOMAYOR & RABINOVICH 2000), apoptose (DIAS-BARUFFI *et al.,* 2003), a tolerância e a embriogênese feto-materna(VAN DEN BRULE *et al.*, 1997, BLOIS *et al.*, 2007), dentre outros.

A Gal-1 já foi detectada em alguns tipos celulares como em células epiteliais do timo (BAUM *et al.,* 1995), células T primadas com antígeno (BLASER *et al.,* 1998), macrófagos ativados (RABINOVICH *et al.,* 1996), células B ativadas (ZUNIGA *et al*., 2001), células endoteliais (LA *et al.,* 2003), e células do estroma e órgãos linfóides murinos como o timo e linfonodo (CHIARIOTTI *et al.,* 1999, RABINOVICH *et al.,* 2002). Além disso, participa do controle do tráfico de células T (NORLING *et al.,* 2008), favorece a apoptose seletiva de células Th1 e Th17 dado o padrão de

glicosilação α2-3 sialiltransferases (ST3Gal1) destas células (TOSCANO *et al.,* 2007), participa do mecanismo regulatório das células Treg naturais (GARIN *et al.,* 2007), e estimular a expansão de células Treg induzíveis (Figura 2) (TOSCANO *et al*., 2006). Ainda, a Gal-1, pode induzir a secreção de IL-10, IL-2 e inibir a liberação de IFN-γ (VAN DER LEIJ *et al.,* 2007, TOSCANO *et al*, 2007, STOWELL *et al*., 2008, CEDENO-LAURENT *et al*., 2012). Um possível mecanismo molecular de regulação de células Th1 por galectina-1 envolve a inibição da sinalização da via do NF-kB (TOSCANO *et al.,* 2011). Basicamente, células Th1 ativadas e pró-inflamatórias produzem e secretam Gal-1 via ativação do NF-kB, entretanto, a interação da Gal-1 com glicanas das superfícies de células Th1 ativada bloqueia a liberação de citocinas inflamatórias via a inibição da via do NF-kB (TOSCANO *et al.,* 2011).

Figura 2: Funções Imunorregulatórias de Gal-1 frente a diferentes leucócitos.



Fonte: Adaptado de Arthur *et al*., 2015.

Portanto, essa lectina tem um papel imunorregulatório (VAN DER LEIJ *et al.,* 2004; VAN DER LEIJ *et al.,* 2007) e isto, provavelmente estaria correlacionado com o efeito benéfico da presença de GAL-1 em doenças autoimunes, no processo de

tolerância materno-fetal, no processo de interação patógeno-hospedeiro. Por outro lado, a presença da Gal-1, pode favorecer a progressão de tumores e infecções virais (CAMBY *et al.,* 2006, TOSCANO et al., 2006, PERONE *et al.,* 2006, 2009, WANG *et al.*, 2009, WU *et al*., 2011).

1.4. Antígeno Leucocitário Humano – G (HLA-G): Estrutura e Funções.

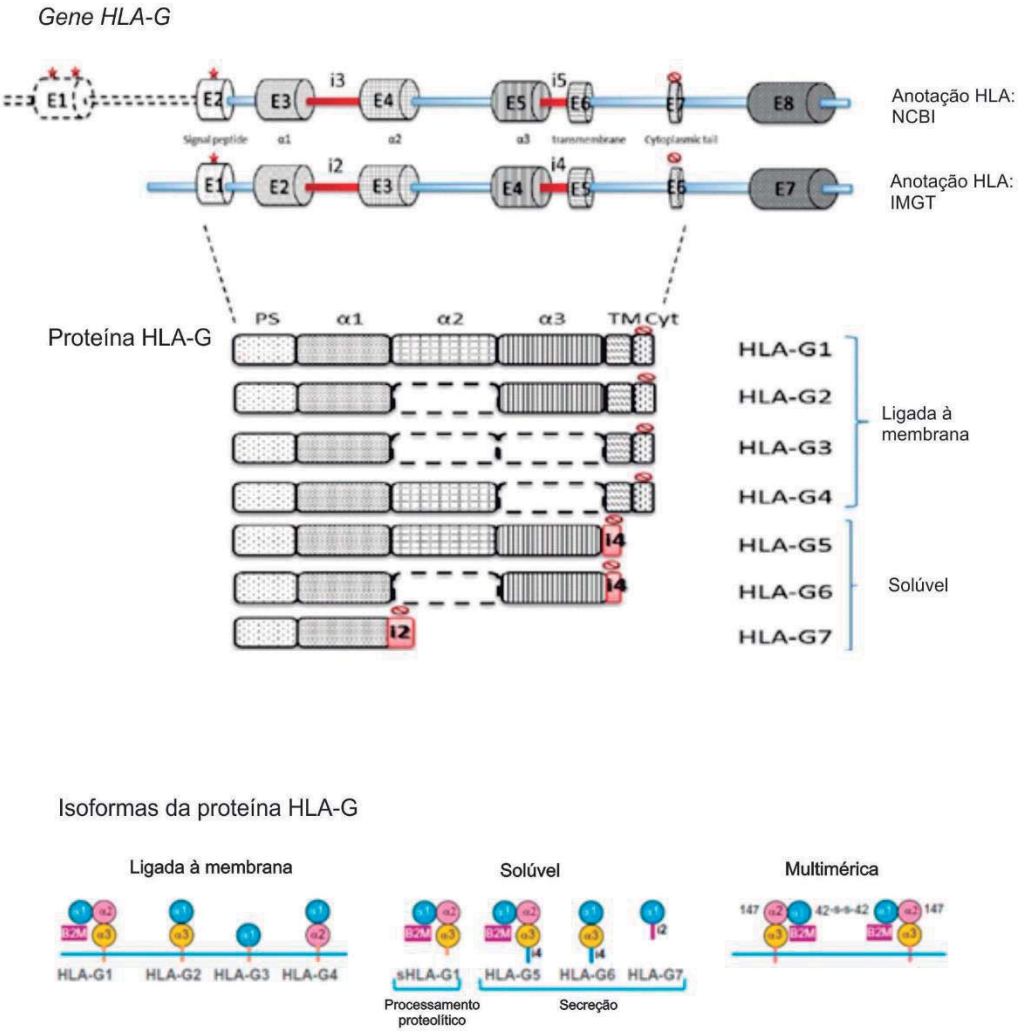
O Antígeno Leucocitário Humano –G (HLA-G) é uma moléula não clássica Ib do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) identificada, em 1986, por Ellis e colaboradores, em células trofoblásticas com atividade imunoregulatória no processo de tolerância materno-fetal. Em 1987, Geraghty e colaboradores a descreveram geneticamente como sendo uma molécula com similaridade gênica aos genes do MHC de classe I clássicos (MHC classe Ia) excetuando pelo número limitado de polimorfismos em sua região codificadora. Sendo assim, o HLA-G foi classificado como sendo uma glicoproteína codificada pelo MHC de classe Ib com função tolerogênica à resposta imunológica (CAROSELLA *et al.,* 2003, CAROSELLA *et al.,* 2008).

Codificado pelo cromossomo 6p.21 o gene *HLA*-G é constituído por 8 éxons e 7 íntrons dos quais o éxon 1 codifica o peptídeo sinal, éxons 2- 4 codificam os domínios extracelulares α1 – α3, éxon 5 codifica região transmembrana e, os íntrons 2 e 4 e o éxon 6 contém códons de finalização “stop códon” (CASTELLI *et al.,* 2014, DONADI et al., 2014, CAROSELLA et al., 2015). A ocorrência de “splicing” alternativos torna possível a codificação de 7 isoformas, sendo quatro isoformas, HLA-G1, G2, G3 e G4, ligadas a membrana, e três isoformas, HLA-G5, G6 e G7, solúveis, em que G1 e G5 são compostas por uma cadeia pesada de 3 domínios globulares ligados não covalentemente a β2-microglobulina, enquanto, as demais isoformas possuem uma estrutura mais simples que carecem de um ou dois domínios globulares e não se ligam covalentemente a β2-microglobulina. Ainda, o HLA-G pode existir em estruturas oligoméricas por meio de ligações dissulfeto estabelecidas entre os resíduos de cisteínas nas posições 42 e 147, Cys42-Cys42 ou Cys42-Cys147 (Figura 3) (BOYSON *et al.,*2002, GONEN-GROSS *et al.,*2003, SHIROISHI *et al*., 2006, ALEGRE *et al.,* 2014, CAROSELLA et al., 2015).

O gene do HLA-G apresenta um limitado número de polimorfismos geralmente presentes nas regiões promotora 5'UTR (UTR- *unstralated region*) e 3'UTR como elementos gênicos regulatórios e na regulação gênica pós-traducional, respectivamente (CASTELLI *et al.,* 2014). Os elementos gênicos regulatórios, 5'UTR, implicam diretamente no padrão de expressão proteica tecido-restrita do HLA-G, o qual apresenta-se constitutivo nas células trofoblásticas, no timo, na córnea, no pâncreas, na matriz proximal das unhas, nos eritroblastos e nas células mesenquimais (MOREAU *et al.,* 2003, VAN DER ELSEN, 2011, CASTELLI *et al.,*2014, CAROSELLA *et al*., 2015).

Quanto ao perfil de regulação gênica pós-transcricional do HLA-G os miRNAs: miR-133a, miR-148a, miR-148b, miR-152, miR-365, miR133, miR-139-5p, mir-548, mir-608, mir-628 interferem na estabilidade do transcrito gênico do HLA-G, inibindo sua expressão proteica, o qual possui função relevante na modulação da resposta imune. Foi observado que elevados níveis de miRNAs específicos para o *HLA-G* restaura a citototoxicidade mediada por células NK contra alvos celulares (CASTELLI *et al.,* 2014, MORI *et al.,* 2016, SELIGER *et al*, 2016).

Figura 3: Esquema do locus gênico do HLA-G e das suas isoformas proteicas. A tradução do gene do HLA-G promove, por processamento alternativo de RNAm, diferentes isoformas proteicas (-G1 a -G7) com distintas caractarísticas bioquímicas/estruturais como associação ou não (formas solúveis) com a membrana celular, interação não-covalente com a proteína β2-microglobulinas, processamento proteolítico e oligomerização.



Fonte: Adaptado de Carosella *et al.,* 2015.

A atividade imunossupressora do HLA-G se dá pela interação específica de cada domínio globular presente na molécula aos receptores CD85J (ILT-2), CD85D (ILT-4), CD158d (KIR2DL4) e CD160 (BY55), os quais estão presentes, respectivamente, em células B, células Natural Killers (NK) e células T; macrófagos; células NK; e, em células endoteliais, células NK e células T, promovendo assim a indução da apoptose em linfócitos T $CD8^+$ antígeno específicos (LILA *et al.*, 2001, CONTINI *et al.,* 2003), inibição da atividade de citotoxicidade de células CTL e NK (CAROSELLA *et al.*, 1999), (LEMAOULT *et al.,* 2003, BORTOLOTTI *et al.*, 2014), a

regulação da adesão vascular transendotelial (DORLING *et al*., 2000), inibe a ativação e amadurecimento de DCs (LIANG *et al.,* 2003) e de linfócitos T $CD4^+$ (BAINBRIDGE, 2000), induz a formação de células T regulatórias por meio da trogocitose ou da diferenciação de células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ virgens para células com função imunossupressora sobre demais linfócitos T por secretarem IL-10 e TGF-β (LILA *et al*, 2001), inibição da angiogênese (MENIER *et al*., 2004, FONS *et al*., 2006, CAROSELLA *et al.,* 2011).

Devido a todas estas propriedades imunorregulatórias, o HLA-G tem sido reconhecido como uma molécula tolerogênica cuja regulação positiva pode proteger ou prejudicar o indivíduo. Contextos patofisiológicos em que a regulação positiva do HLA-G acarreta em proteção ao indivíduo são: o sucesso da aceitação do aloenxerto transplantado (BIELDRON *et al.,* 2015), a implantação do embrião no início da gestação (CLARK *et al*., 2013), evolução clínica de doenças autoimune e inflamatórias cuja progressão ocorre de maneira mais lenta quando comparada com pacientes com baixos níveis de expressão de HLA-G (MURDACA *et* al., 2016, ZAHEDNASAB *et al*., 2016). De modo contrário, os prejuízos acarretados pela regulação positiva do HLA-G são descritos na infecção viral do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (VIGANO *et al.,* 2017), vírus da hepatite C (VHC) (AMIOT *et al*., 2014), infecção bacteriana por Helicobacter pylori (SOUZA *et al*., 2016) e, em diferentes níves de expressão em doenças cancerígenas tais como como glioblastoma, mieloma múltiplo, carcinoma de ovário, leucemia linfocítica e pulmão (PISTOIA *et al.,* 2007).

1.5. As moléculas imunorregulatórias (HLA-G e Galectina-1) e a doença autoimune DM1.

A Gal-1 e o HLA-G desempenham papéis importantes na modulação do sistema imune conferindo tolerância imunológica (CEDENO-LAURENTA *et al*., 2012, BARRIENTOS *et* al., 2014, CAROSELLA *et* al., 2015, GREGORI, 2016, SASAGURI *et al*., 2016, FERREIRA *et al*., 2017). No entanto, atualmente, são escassas as informações sobre a presença e/ou função de Gal-1 e do HLA-G no processo de modulação da resposta imune no desenvolvimento do DM1 humano e experimental.

Dados da literatura mostram que células dendríticas obtidas de camundongos diabéticos "*Non-Obese Diabetic* - NOD" e transgênicas para o gene da Gal-1 (DC-Gal-1) foram capazes de induzir apoptose em clone "diabetogenic" de células T. Ainda, quando estas células DC-Gal-1 foram injetadas nos camundongos NOD (modelo experimental para DM1), em estágios subclínicos do DM1, ocorreu uma deleção de células T periféricas autoreativas, aumento de células T secretoras de IL-4 e IL-10, retardo nos sintomas do diabetes e na insulite (PERONE *et al.* 2006). O mesmo grupo demonstrou que o tratamento de animais NOD com Gal-1 solúvel previne a instalação da hiperglicemia, impede a invasão das ilhotas pancreáticas por células Th1 anti-células β e aumenta a porcentagem de células T secretoras de IL-1, IL-5 e IL-10 no pâncreas (PERONE *et al.,* 2009). De modo interessante, a administração de Gal-1 exógena foi também capaz reverter a autoimunidade para células β e a hiperglicemia de animais NOD com DM 1 em curso (PERONE *et al.,* 2009).

Ainda nessa linha, foi sugerido por outros que células T autoreativas ($CD4^+$ ou $CD8^+$) de camundongos NOD podem ser resistentes ao efeito supressor de células T regulatórias mediado por Gal-1 (WU *et al.,* 2011). O mecanismo dessa resistência pode estar associado à redução da expressão de um ligante para esta lectina, o gangliosídeo GM1, nas superfícies de células T específicas para antígenos de células *β* (WANG *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2011).

Jiang e colaboradores (2009) propuseram que a Gal-1 poderia compor um protocolo de tratamento de pacientes com DM1 uma vez que esta lectina seria capaz de induzir a apoptose de células T autorreativas e específicas para células β. Assim, desta forma, a Gal-1 poderia cooperar para a restauração da tolerância a antígenos próprios destas células em pacientes com DM1. Curiosamente, monócitos do sangue periférico de pacientes com DM1, estimulados ou não, secretam baixos níveis de Gal-1 em comparação com células de indivíduos sadios (GÓMEZ-TOURIÑO *et al.,* 2011). Segundo estes pesquisadores esta baixa capacidade de síntese da molécula imunoreguladora Gal-1 pode auxiliar na manutenção de um cenário de inflação autoimune em pacientes com DM1.

Em relação ao HLA-G foi descrito a associação de polimorfismos na região 3'UTR aumentar as taxas de risco ao DM1. Cita-se os genótipos del/del ou del/ins

presente no polimorfismo 14pb inserção/deleção, o polimorfismo de base única (“Single Nucleotide Polymorphism – SNP”). Ainda, o alelo +3001 T presente exclusivamente em pacientes DM1, o qual em desequilíbrio de ligação como o genótipo +3010 CC e o haplótipo 14pb DEL / + 3001C / + 3003T / + 3010C / + 3027C / + 3035C / + 3142G / + 3187A / + 3196C , conferiram baixa e moderada expressão do HLA-G nos pacientes DM1 avaliados (ALBUQUERQUE *et al.,*2016).

Montanucii e colaboradores, 2012, ao avaliarem os efeitos do padrão de resposta Th17 e de células Treg de células PBMCs oriundas de pacientes DM1 e de indivíduos saudáveis quando submetidas ao tratamento com IFN-γ ou com células-tronco mesenquimais derivadas de Sangue de Cordão Umbilical envolvidas em microcápsulas imunes (CPS-hUCMS), observaram o aumento da expressão de transcritos e de proteína do HLA-G5 quando PBMCs foram co-cultivadas com CPS-hUCMS. A expressão do HLA-G5 foi superior nas PBMCs de indivíduos saudáveis do que nos pacientes DM1. No entanto, o desencadeamento da expressão de HLA-G5 sugere a correlação do mesmo na atividade imunossupressora do DM1, a qual reduz a ação de células Th1 efetoras, favorece a expansão de Treg e assim, promove o reequilíbrio da razão células T efetoras / células Treg no contexto do DM1. Quanto às células Th17, os autores não encontraram associação de indução do HLA-G pelas CPS-UCMS favorecendo a expressão dessas células.

Portanto, o desequilíbrio na resposta imunológica associado a atividade de células T (CD4 e/ou CD8) autoreativas com padrão imunofenotípico relacionado a uma resposta proinflamatória contribui para destruição de células β pancreáticas, com consequente insulite. Logo, no presente trabalho buscamos investigar a potencial participação de duas moléculas imunoregulatórias endógenas, GAL-1 e HLA-G, no diabetes *mellitus* autoimune.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho trouxe a descrição do procedimento de obtenção da isoforma solúvel de HLA-G6 o que permite a aplicabilidade desta para melhor compreensão estrutural, bioquímica e funcional desta isoforma, incluindo, o uso em ensaios terapêuticos em modelos inflamatórios.

Portanto, o conjunto de resultados sugere que possa ocorrer uma regulação positiva da expressão de transcritos do HLA-G em pacientes com DM1 e que a presença de GAL-1 endógena pode favorecer o DM1 experimental. Estes dados abrem novas perspectivas para o melhor entendimento da imunopatologia do DM-1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDIANKENARI S., ESLAMI M.B., SARRAFNEJAD A., MOHSENI M., LARIJANI B. Dendritic Cells Bearing HLA-G Inhibit T-Cell Activation in Type 1 Diabetes. **Iran J Allergy Asthma Immunol**. 2007; 6(1): 1-7

AGAUGUÉ S, CAROSELLA E & ROUAS-FREISS N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17 **Blood**, 2011, Vol. 117, N.2, 7021-7031.

ALBERTI KGMM, ZIMMET PZ, WORLD HEALTH ORGANIZATION CONSULTATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO, 1999.

ALEGRE, E., et al., Some basic aspects of HLA-G biology**. J Immunol Res**, 2014: p. 657625.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes—2016. **Diabetes Care**. 2016;39(suppl 1):S1-S106.

AMIOT, L., et al., Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **J Hepatol,** 2014. 60(2): p. 245-52.

ANDERSON M. S. & BLUESTONE J. A. The NOD mouse: A model of immune dysregulation. **Annu. Rev. Immunol.** 2005. 23:447–85. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643

APPLIED BIOSYSTEMS APLICATION NOTE. Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays - TaqMan Gene Expression Assays Average 100% efficiency.(Part number 105622). **Applied Biosystems**, USA, publication, 2006. 127-05.

ARTHUR CM, BARUFFI MD, CUMMINGS RD, STOWELL SR. Evolving mechanistic insights into galectin functions. **Methods Mol Biol**. 2015;1207:1-35.

ASSEMAN C, MAUZE S, LEACH MW, COFFMAN RL, POWRIE F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J Exp Med**. Vol.190, N.7, 995–1004, 1999.

ATLAS OF GENETICS AND CYTOGENETICS IN ONCOLOGY AND HAEMATOLOGY. HLA-G (major histocompatibility complex, class I, G. Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/HLAGID43744ch6p22.html>. Acessado em: 16 de outubro de 2016.

ATKINSON M.A., EISENBARTH G.S. & MICHELS A. W. Type 1 diabetes. **Lancet;** Vol.383, N.9911: 69–82, Janeiro 2014. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7.

BAINBRIDGE D.R., ELLIS S.A. SARGENT I.L. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. **J Reprod Immunol**. 2000. 48, 17-26.

BARKER JM, MCFANN K, HARRISON LC, FOURLANOS S, KRISCHER J, CUTHBERTSON D. et al. Pre-type 1 diabetes dysmetabolism: maximal sensitivity achieved with both oral and intravenous glucose tolerance testing**. J Pediatr**. Vol. 150, N.1, 31-36, 2007.

BARONDES SH, CASTRONOVO V, COOPER DN, CUMMINGS RD, DRICKAMER K, FEIZI T, GITT MA, HIRABAYASHI J, HUGHES C, KASAI K, et al. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins**. Cell** 1994;76:597-598.

BARRIENTOS G, FREITAG N, TIRADO-GONZÁLEZ I, UNVERDORBEN L, JESCHKE U, THIJSSEN VL, BLOIS SM. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. **Hum Reprod Update**. 2014 Mar-Apr;20(2):175-93.

BAYRY J, GAUTIER JF. Regulatory T Cell Immunotherapy for Type 1 Diabetes: A Step Closer to Success? **Cell Metab**. 2016 Feb 9;23(2):231-3.

BARRIENTOS G, FREITAG N, TIRADO-GONZÁLEZ I, UNVERDORBEN L, JESCHKE U, THIJSSEN VL, BLOIS SM. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. **Hum Reprod Update**. 2014

BEHURA SK, SEVERSON DW. Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes**. Biol Rev Camb Philos Soc.** 2013 Feb;88(1):49-61.

BIEDRON, M., et al., The role of soluble HLA-G and HLA-G receptors in patients with hematological malignancies after allogeneic stem cell transplantation. **Med Oncol,** 2015. 32(8): p. 219.

BLOIS SM, ILARREGUI JM, TOMETTEN M, GARCIA M, ORSAL AS, CORDO-RUSSO R, TOSCANO MA, BIANCO GA, KOBELT P, HANDJISKI B, et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. **Nat Med** 2007;13:1450-1457.

BLUESTONE J.A., HEROLD K. & EISENBARTH G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes**. Nature**. Vol 464, 1293 -1300, Abril 2010.

BLUESTONE JA, BUCKNER JH, FITCH M, GITELMAN SE, GUPTA S, HELLERSTEIN MK, HEROLD KC, LARES A, LEE MR, LI K, LIU W, LONG SA, MASIELLO LM, NGUYEN V, PUTNAM AL, RIECK M, SAYRE PH, TANG Q. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. **Sci Transl Med.** 2015 Nov 25;7(315):315ra189.

BOYSON JE, ERSKINE R, WHITMAN MC, et al. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. **Proc Natl Acad Sci** U S A 2002;99:16180-16185.

BORTOLOTTI D, GENTILI V, ROTOLA A, CASSAI E, RIZZO R, DI LUCA D.Impact of HLA-G analysis in prevention, diagnosis and treatment of pathological conditions.**World J Methodo**l. 2014 Mar 26;4(1):11-25.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 13/10/2016. Franco LJ. Um problema de saúde pública. Epidemio.

BRIZEL DM, SIBLEY GS, PROSNITZ LR, SCHER RL, DEWHIRST MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. Int J Radiation **Oncol Biol Phys** 1997;38. 285–189.

BRENOL CV, VEIT TD, CHIES JA, XAVIER RM. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. **Rev Bras Reumatol.** 2012 Feb;52(1):82-91.

BUTLER AE, GALASSO R, MEIER JJ, BASU R, RIZZA RA, BUTLER PC. Modestly increased beta-cell apoptosis but no increased betacell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis. **Diabetologia.** Vol. 50, N. 11, 2323-2331, 2007.

CEDENO-LAURENT F, OPPERMAN M, BARTHEL SR, KUCHROO VK, DIMITROFF CJ. Galectin-1 triggers an immunoregulatory signature in Th cells functionally defined by IL-10 expression. **J Immunol.** 2012 Apr 1;188(7):3127-37.

CAMBY I, BELOT N, RORIVE S, LEFRANC F, MAURAGE CA, LAHM H, KALTNER H, HADARI Y, RUCHOUX MM, BROTCHI J, et al. Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. **Brain Pathol** 2001;11:12-26.

CAMBY, I.; LE MERCIER, M.; LEFRANC, F.; KISS, R. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, Nov, p.137R-157R. 2006.

CAO X, CAI SF, FEHNIGER TA, SONG J, COLLINS LI, PIWNICA-WORMS DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. **Immunity**.Vol. 27, N. 4, 635-646, 2007.

CAROSELLA, E.D., DAUSSET J., E ROUAS-FREISS N., Immunotolerant functions of HLA-G. **Cell Mol Life Sci**, 1999. 55(3): p. 327-33.

CAROSELLA ED, MOREAU P, LE MAOULT J, LE DISCORDE M, DAUSSET J, ROUAS-FREISS N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv Immunol**. 2003;81:199-252.

CAROSELLA ED, MOREAU P, LEMAOULT J, ROUAS-FREISS N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunol**. 2008;29:125-32

Carosella ED, Rouas-Freiss N, Tronik-Le Roux D, Moreau P, LeMaoult J. HLA-G: An Immune Checkpoint **Molecule. Adv Immunol.** 2015;127:33-144.

CASTELLI EC, VEIGA-CASTELLI LC, YAGHI L, MOREAU P, DONADI EA.Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. **J Immunol Res.** 2014; 2014:734068.

CLARK, G.F. AND D.J. SCHUST, Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. **Front Immunol,** 2013. 4: p. 26.

CONTINI P, GHIO M, POGGI A, FILACI G, INDIVERI F, FERRONE S, PUPPO F. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **Eur J Immunol.** 2003 Jan; 33(1):125-34

CORDERO EA, VEIT TD, DA SILVA MA, JACQUES SM, SILLA LM,CHIES JA. HLA-G polymorphism influences the susceptibilityto HCV infection in sickle cell disease patients. **Tissue Antigens.** 2009; 74: 308-313.

CORREIA, F., SANTALHA M., MEIRELES C., FONSECA F., COSTA A. Monogenic diabetes: the relevance of molecular diagnosis. Revista Portuguesa de Endocrinologia, **Diabetes e Metabolismo**, Vol. 6, N2, 64-68, 2011.

COSTA, F. R., FRANÇOZO, M.C., DE OLIVEIRA, G. G., IGNACIO, A., CASTOLDI, A, ZAMBONI D. S., RAMOS S.G., CÂMARA N. O., DE ZOETE M. R., PALM N. W., FLAVELL R. A., SILVA J.S., CARLOS D. Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activationand contributes to T1D onset. **J Exp Med.** 2016 Jun 27;213(7):1223-39.

CRISPIM JC, DUARTE RA, SOARES CP, COSTA R, SILVA JS, MENDES-JÚNIOR CT, WASTOWSKI IJ, FAGGIONI LP, SABER LT, DONADI EA. Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Transpl Immunol.** 2008 Feb;18(4):361-7. Epub 2007 Nov 26.

CRISPIM JC, MENDES-JUNIOR CT, WASTOWSKI IJ, COSTA R, CASTELLI EC, SABER LT, DONADI EA. Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. **Tissue Antigens**. 2008 Jan;71(1):35-41. Epub 2007 Oct 29.

CUMMINGS, R. D.; LIU, F. T. Galectins. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. ETZLER, M. E. Essentials of Glycobiology. **Cold Spring Harbor** (NY), 2nd ed., 2009

CURIGLIANO G., CRISCITIELLO C., GELAO L.et al. Molecular Pathways: Human Leucocyte Antigen G (HLA-G). **Clin Cancer Research.** 2013;19:5564-5571

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; CHO, M.; KARMAKAR, S.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. **J Biol Chem,** v. 278, n. 42, Oct 17, p.41282-41293. 2003.

DIAS-BARUFFI M1, STOWELL SR, SONG SC, ARTHUR CM, CHO M, RODRIGUES LC, MONTES MA, ROSSI MA, JAMES JA, MCEVER RP, CUMMINGS RD. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle**. Glycobiology**. 2010 May;20(5):507-20.

DIB S.A. Heterogeneity of type 1 diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metab** Vol.52, N.2, São Paulo, Março. 2008.

DONADI E.A., CASTELLI E.C., ARNAIZ-VILLENA A., ROGER M., REY D., MOREAU P., Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association**. Celular and Molecular Life Sciences**. Vol. 68, N.3, 369-395, 2011

ELLIS S.A., PALMER M.S., MCMICHAEL A.J. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule**. J Immunol**, (1990). 144, 731-5.

EISENBARTH G.S. & JEFFREY J. The natural history of type 1A diabetes**. Arq Bras Endocrinol Metab** , Vol.52, N.2:146-155, 2008.

EKOÉ JM, REWERS M, WILLIAMS R et al., eds. **The epidemiology of diabetes mellitus.** 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008.

FAHLEN L, READ S, GORELIK L, HURST SD, COFFMAN RL, FLAVELL RA, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **J Exp Med**. Vol. 201 N.5, 737–746, 2005.

FAUSTMAN D. L. MHC class I and autoimmune diabetes**. Biomed & Pharmacother,** Vo. 47, 3-10, 1993.

FAUSTMAN D. L. Mechanisms of autoimmunity in type 1 diabetes**. Journal of Clinical Immunology**, Vo. 13, N.1, 1993.

FAVIER B., LEMAOULT J., ROUAD-FREISS N., MOREAU P. et al. Research on HLA-G: an update. **Tissue Antigens**. 2006, 69(3):207-11.

FAVIER B. HOWANGYIN K., WU J., CAUMARTIN,J., DAOUYA M. ET AL.,Tolerogenic fubction of dimeric forms of HLA-G recombinant proteins: a comparative study in vivo. **PlosOne,.** (2011), 6, n7 (doi: 10.1371/journall.pone.0021011.

FERREIRA LM, MEISSNER TB, TILBURGS T, STROMINGER JL. HLA-G: At the Interface of Maternal-Fetal Tolerance. **Trends Immunol.** 2017 Mar 6. pii: S1471-4906(17)30023-6.

FONS P, CHABOT S, CARTWRIGHT JE, LENFANT F, et al., Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells**. Blood**, 2006. 108(8): p. 2608-15.

FOULIS AK, MCGILL M, FARQUHARSON MA. insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man - macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. **J Pathol**. Vol, 165, N.2, 97-103, 1991.

FOURLANOS S., DOTTA F., GREENBAUM C.J., PALMER J.P., ROLANDSSON O., COLMAN P. G., HARRISAN L. C. Latent autoimune diabetes in adults (LADA) should be less latente. **Diabetologia**. Dezembro, 2005. DOI: 10.1007/s00125-005-1960-7.

GAO, G. F., WILLCOX, B. E., WYER, J. R., BOULTER, J. M., O'CALLAGHAN, C. A., MAENAKA, K., STUART, D. I., JONES, E. Y., VAN DER MERWE, P. A., BELL, J. I. & JAKOBSEN, B. K. Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8alphaalpha. **J. Biol. Chem.** (2000), 275,15232–15238.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES**. GST gene fusion system**. Disponível em: <http://proteins.gelifesciences.com/~/media/protein-purification-ib/documents/handbooks/gst_gene_fusion_system_handbook.pdf?la=en.> Acessado em: 05/03/2017.

GERAGHTY D.E., KOLLER B.H., ORR, H.T. A human major histocompatibility complex A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment**. Proc Natl Acad Sci** U S A, 1987. 84, 9145-9.

GEENEN V. Thymus and type 1 diabetes: an update. **Diabetes Res Clin Pract**. 2012. Oct;98(1):26-32

GOBIN SJ , VAN DEN ELSEN PJ. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA -E,HLA-F,and HLA-G. **Hum Immunol.** 2000 Nov; 61(11):11027

GONEN-GROSS T, ACHDOUT H, GAZIT R, et al. Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function. **J Immunol** 2003;171:1343-1351

GRASER, R. T., T. P. DILORENZO, F. WANG, G. J. CHRISTIANSON, H. D. CHAPMAN, D. C. ROOPENIAN, S. G. NATHENSON, and D. V. SERREZE. Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. **J. Immunol**. Vol:164: 3913–3918. 2, 2000.

GREGORI S. Editorial: HLA-G-Mediated Immune Tolerance: Past and New Outlooks. **Front Immunol.** 2016 Dec 27;7:653.

GROSS JL, SILVEIRO SP, CAMARGO JL et al. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002; 46: 16-26.

HASKINS, K., and M. MCDUFFIE. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4 islet-specific T cell clone. **Science.** Vol. 249: 1433–1436, 1990.

HEROLD K.C., VIGNALI D.A.A, COOKE A. et al., Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. **Nature Immunology.** Vol. 13, 243-256, Abril 2013.

ILLUMINA. **TruSeqTM Small RNA Sample prepariton guide.** Novembro 2010.

ILLUMINA. **An introduction to Next-Generation Sequencing Technology.** Maio 2016.

JONGBLOET PH, GROENEWOUD HM, HIRASING RA, VAN BS. Seasonality of birth in patients with childhood diabetes in The Netherlands. **Diab care;** Vol. 21, 190–191, 1998.

KAHN HS, MORGAN TM, CASE LD, et al. Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diab care** Vol.32, 2010–2015, 2009.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação.** Rio de Janeiro, IBGE, 2014, 180p.

JIA B, JEON CO. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. **Open Biol.** 2016 Aug;6(8).

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION**. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 6aed. Brussels: International Diabetes Federation, 2014.** Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 19/01/2014.

KNOWLER WC, FOWLER SE, HAMMAN RF et al. DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. **Lancet.** 2009; 374:1677-86.

LAITINEM O., HONKANEM H., PAKKANEM O. et al., Coxsackievirus B1 is associates with induction of β-cell autoimmunity that portends Type 1 diabetes. **Diabetes**, Vol. 63, 446 – 455, Fevereiro de 2014.

LEMAOULT J., LE DISCORDE M., ROUAS-FREISS N., MOREAU P., MENIER C., MCCLUSKEY J. CAROSELLA E.D.. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. **Tissue Antigens.** 2003. 62, 273-84.

LEMAOULT, J. ZAFARANLOO K, LE DANFF C, CAROSELLA ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. **FASEB J**. (2005) 19, 662–664.

LE PAGE ME, GOODRIDGE JP, JOHN E, CHRISTIANSEN FT, WITT CS.Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN-γ responses to soluble HLA-G preparations. **J Immunol.** 2014 Jan 15;192(2):732-40.

LESLIE D. & VALERI C.. Latente autoimmune diabetes in adults (LADA). **Health Delivery**, Volume 48, p. 14-16, Dezembro de 2003.

LI C, TOTH I, SCHULZE ZUR WIESCH J, PEREYRA F, RYCHERT J,ROSENBERG ES, VAN LUNZEN J, LICHTERFELD M, YU XG. Functional characterization of HLA-G+ regulatory T cells in HIV-1infection. **PLoS Pathog**. 2013; 9: 1003-140.

LIANG S, HORUZSKO A. Mobilizing dendritic cells for tolerance by engagement of immune inhibitory receptors for HLA-G. **Hum Immunol.** 2003 Nov;64(11):1025-32.

LILA N., ROUAS-FREISS N., DAUSSET J. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cell regulatory mechanism. **Proc Natl Acad Sci** USA. 2001. 98:12150-12155.

LIVAC K.J, SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-ddCt method. **Methods.** 2001; 25:401-408 243

MALEK TR. The biology of interleukin-2. **Annu Rev Immunol**. 2008; 26:453–479.

MARCHAL-BRAS-CONCALVES R., ROUAS-FREISS N., CAROSELLA E.D., KIRSZENBAUN M., GUILLET J. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Transplant Proc.** 2001. 33:2355–2359.

MARIE JC, LETTERIO JJ, GAVIN M, RUDENSKY AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Exp Med.** Vol. 201, N.7,1061–1067, 2005.

MCKINNEY PA. Seasonality of birth in patients with childhood Type I diabetes in 19 European regions. **Diabetologia**, V.44 (Suppl 3):B67–B74, 2001.

MENIER, C., RABREAU M., CHALLIER J., et al., Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, 2004. 104(10): p. 3153-60.

MENIER C, SAEZ B, HOREJSI V, MARTINOZZI S, KRAWICE-RADANNE I, BRUEL S, LE DANFF C, REBOUL M, HILGERT I, RABREAU M, LARRAD ML, PLA M, CAROSELLA ED, ROUAS-FREISS N. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. **Hum Immunol**. 2003 Mar;64(3):315-26.

MILLER, J. B., M. C. APPEL, J. J. O'NEIL, AND L. S. WICKER. Both the lyt-2 and l3t4 t cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. **J. Immunol**. 140: 52–58. 1988.

MITRE T.M., PIETROPAOLO M., KHADRA A. The dual role of autoimmune regulator in maintaining normal expression level of tissue-restricted autoantigen in the thymus: A modeling investigation. **Math Biosci**. 2016 Oct 17.

MORRAN M.P., VONBERG A., KHADRA A., PIETROPAOLO M. Immunogenetics of type 1 Diabetes mellitus. **Mol Aspects Med.** Vol. 42, 42–60. Abril, 2015. doi:10.1016/j.mam.2014.12.004.

MOREAU P, MOUILLOT G, ROUSSEAU P, MARCOU C, DAUSSET J, CAROSELLA ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proc Natl Acad Sci** U S A. 2003;100:1191-6.

MOUILLOT G, MARCOU C, ROUSSEAU P, ROUAS-FREISS N, CAROSELLA ED, MOREAU P. HLA-G gene activation in tumor cells involves cis-acting epigenetic changes. **Int J Cancer**. 2005 Mar 1;113(6):928-36.

MURDACA, G., et al., Immunoregulatory Role of HLA-G in Allergic Diseases. **J Immunol Res,** 2016. 2016: p. 6865758.

NABIH ES, ANDRAWES NG. The Association Between Circulating Levels of miRNA-181a and Pancreatic Beta Cells Dysfunction via SMAD7 in Type 1 Diabetic Children and Adolescents. **J Clin Lab Anal**. 2016 Sep; 30(5):727-31. doi:10.1002/jcla.21928. PubMed PMID: 26892629.

NEPOM G. T. & BUCKNER J. A functional framework for interpretation of genetic associations in T1D. **Current Opinion in Immunology**. Vol. 24, 516–521, Julho de 2012.

OLIVEIRA C.S.V., FURUZAWA A.K. & REIS A.F. Diabetes Mellitus tipo Mody. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Vol.46, N.2 São Paulo. Abril, 2002.

OLIVEIRA E.H., MACEDO C, DONATE PB,et al., Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire). **Immunobiology.** 2013 Jan;218(1):96-104.

PATTERSON RJ, HAUDEK KC, VOSS PG, WANG JL. Examination of the role of galectins in pre-mRNA splicing. **Methods Mol Biol.** 2015;1207:431-49.

PERILLO NL, UITTENBOGAART CH, NGUYEN JT, BAUM LG. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. **J Exp Med 1**997;185:1851-1858.

PETERSON, J. D., and K. HASKINS. Transfer of diabetes in the NOD-scid mouse by CD4 T cell clones. Differential requirement for CD8 T cells. **Diabetes**. Vol.45: 328 – 336, 1996.

PIETROPAOLO M., TOWNS R. & EISENBARTH G.S. Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes. **Cold Spring Harb Perspe**ct Med,2:a012831, 2012.

PISTOIA, V., et al., Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? **Semin Cancer Biol**, 2007. 17(6): p. 469-79.

PUNDZIUTE-LYCKA A, URBONAITE B, DAHLQUIST G. Infections and risk of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Lithuanian children. **Diabetol**; Vol.43, 1229–1234, 2000.

RABINOVICH GA, DALY G, DREJA H, TAILOR H, RIERA CM, HIRABAYASHI J, CHERNAJOVSKY Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis**. J Exp Med** 1999;190:385-398.

RABINOVICH GA, RAMHORST RE, RUBINSTEIN N, CORIGLIANO A, DAROQUI MC, KIER-JOFFE EB, FAINBOIM L. Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. **Cell Death Differ** 2002;9:661-670.

RICCI G., PIRILLO I., TOMASSONI D., SIRIGNANO A. & GRAPPASONNI I. Metabolic syndrome, hypertension, and nervous system injury: Epidemiological correlates, Clinical and Experimental Hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension.** Jan/2017. DOI:10.1080/10641963.2016.1210629

RODRIGUEZ-CALVO T. & von HERRATH M.G. Enterovirus Infection and Type 1 Diabetes: Closing in on a Link? **Diabetes**. Vol. 64, 1503–1505, maio de 2015.

ROUSSEAU P, LE DISCORDE M, MOUILLOT G, MARCOU C, CAROSELLA ED, MOREAU P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA -G gene influences HLA-G mRNA stability. **Hum Immunol.** 2003 Nov; 64(11):1005-10

ROSANO G. & CECCARELLI E. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front. Microbiol**., 17 April 2014 | https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172.

ROUAS-FREISS N, GON¸ CALVES RM-B, MENIER C, DAUSSET J, CAROSELLA ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from

maternal uterine natural killer cytolysis. **Proc Natl Acad Sci** U S A. 1997;94:11520–5.

ROUAS-FREISS N, MOREAU P, LEMAOULT J, CAROSELLA ED. The dual role of HLA-G in cancer. **J Immunol Res.** 2014;2014:359748.

SABER LT, MOREAU P, DONADI EA. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. **Hum Immunol.** 2012 Jan;73(1):52-9. Epub 2011 Oct 14.

SASAGURI K, YAMADA K, NARIMATSU Y, OONUKI M, OISHI A, KODA K, KUBO KY, YAMAMOTO T, KADOYA T. Stress-induced galectin-1 influences immune tolerance in the spleen and thymus by modulating CD45 immunoreactive lymphocytes. **J Physiol Sci.** 2016 Aug 29.

SCHRANZ D.B. & LERNMARK A. Immunology in diabetes: an update. **Diabetes Metab. Rev.** Vol.14, 3–29,1998.

SEBASTIANI, G., VENDRAME, F., DOTTA, F. MicroRNAs as new tool for exploring type 1 diabetes: relevance for immunomodulation and transplantation therapy Transplant. **Proc**., 43 (1) (2011), pp. 330–332.

SELIGER B. Role of microRNAs on HLA-G expression in human tumors. **Hum Immunol.** 2016 Sep;77(9):760-3.

SEYHAN AA, NUNEZ LOPEZ YO, XIE H, YI F, MATHEWS C, PASARICA M, PRATLEY RE. Pancreas-enriched miRNAs are altered in the circulation of subjects with diabetes: a pilot cross-sectional study. **Sci Rep.** 2016 Aug 25;6:31479.

SHI WW, LIN A, XU DP, BAO WG, ZHANG JG, CHEN SY, LI J,YAN WH. Plasma soluble human leukocyte antigen-G expressionis a potential clinical biomarker in patients withhepatitis B virus infection. Hum Immunol. 2011; 72: 1068-1073

SØRENSEN H.P. and MORTENSEN K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology** 115(2):113-28, 2005. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

SOSENKO JM, PALMER JP, GREENBAUM CJ, MAHON J, COWIE C, KRISCHER JP et al. Patterns of metabolic progression to type 1 diabetes in the diabetes Prevention trial-type 1. **Diabetes Care**. Vol. 29, N.3, 643-649, 2006.

SOUZA, D.M., et al., Upregulation of Soluble HLA-G5 and HLA-G6 Isoforms in the Milder Histopathological Stages of Helicobacter pylori Infection: A Role for Subverting Immune Responses? **Scand J Immunol**, 2016. 83(1): p. 38-43.

SOTOMAYOR CE, RABINOVICH GA. “Galectin-1 induces central and peripheral cell death: Implications in T-cell physiopathology”. **Dev Immunol** 2000;7:117-129.

STENE LC, BARRIGA K, HOFFMAN M, KEAN J, KLINGENSMITH G, NORRIS JM et al. Normal but increasing hemoglobin A1c levels predict progression from islet autoimmunity to overt type 1 diabetes: diabetes Autoimmunity study in the Young (dAisY). **Pediatr diabetes.** Vol. 7, N.5, 247-253, 2006.

STRENSTRÖM G., GOTTSÄTER, A., BAKHTADZE E., BERGER B. SUNDKVIST G. Latent autoimmune diabetes in adults definition, prevalence, β-cell function, and treatment. **Diabetes** 54 (Suppl. 2):S68 –S72, 2005.

STOWELL S. R. & CUMMINGS R.D. Galectins Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, 1064-3745 ; 1207;Humana Press (NY), 1rst ed., 2014.

TANG Q, ADAMS JY, PENARANDA C, MELLI K, PIAGGIO E, SGOUROUDIS E, et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. **Immunity.** Vol. 28, N. 5, 687–697. 66.

Tirado-González I, Freitag N, Barrientos G, Shaikly V, Nagaeva O, Strand M, Kjellberg L, Klapp BF, Mincheva-Nilsson L, Cohen M, Blois SM. Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. **Mol Hum Reprod.** 2013 Jan;19(1):43-53.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med.** 1993; 329(14):977-86.

TORRES M.I., MOREAU O, ROUAS-FREISS N., et al. HLA-G today. **Imunologia.** (2001), Vol. 20, N.1, 18-29.

VAISERMAN AM, CARSTENSEN B, VOITENKO VP, et al. Seasonality of birth in children and young adults (0–29 years) with type 1 diabetes in Ukraine. **Diabetologia.** Vol.50, 32–35, 2007.

VAN DEN BRULE FA, FERNANDEZ PL, BUICU C, LIU FT, JACKERS P, LAMBOTTE R, CASTRONOVO V. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. **Dev Dyn** 1997;209:399-405.

VAN DEN ELSEN PJ. Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. **Front Immunol.** 2011 Oct 4;2:48

VIGANO, S., ET AL., HLA-G+ HIV-1-specific CD8+ T cells are associated with HIV-1 immune control. **AIDS**, 2017. 31(2): p. 207-212.

VOSS PG, GRAY RM, DICKEY SW, WANG W, PARK JW, KASAI K, HIRABAYASHI J, PATTERSON RJ, WANG JL. Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1. **Arch Biochem Biophys**. 2008 Oct 1;478(1):18-25.

VUCKOVIC S, WITHERS G, HARRIS M, KHALIL D, GARDINER D, FLESCH I, et al. Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children. **Clin Immunol**. Vol.123, N.3, 281–288, 2007.

XIAO,S., SHILOACH, J., and BETENBAUGH M.J. Engineering Cells to Improve Protein Expression. **Curr Opin Struct Bio**l. 2014 Jun; 0: 32–38. Published online 2014 Apr 3. doi: 10.1016/j.sbi.2014.03.005.

YAMAZAKI S, IYODA T, TARBELL K, OLSON K, VELINZON K, INABA K, et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. **J Exp Med**. Vol.198, N.2, 235–247, 2008.

YAN W., LIN A., CHANG C., FERRONE S. Induction of HLA-G expression in a melanoma cell line OCM-1A following the treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cell Research, 1**5(7):523-531, 2005.

ZAHEDNASAB, H. AND S. KARAMPOOR, The correlation of HLA-G with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol, 2**016. 291: p. 28.

ZHANG Y, FENG ZP, NASELLI G, BELL F, WETTENHALL J, AUYEUNG P, ELLIS JA, PONSONBY AL, SPEED TP, CHONG MM, HARRISON LC. MicroRNAs in CD4(+) T cell subsets are markers of disease risk and T cell dysfunction in individuals at risk for type 1 diabetes. **J Autoimmun**. 2016 Apr;68:52-61.

ZIMMET P., TUOMI T., MACKAY I. R., ROWLEY M. J., KNOWLES W., COHEN M., LANG D.A. Latent Autoimmune Diabetes Mellitus in Adults (LADA): the Role of Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase in Diagnosis and Prediction of Insulin Dependency. **Diabetic Medicine.** Abril 1994. DOI: 10.1111/j.1464-5491.1994.tb00275.

ZUNIGA E, GRUPPI A, HIRABAYASHI J, KASAI KI, RABINOVICH GA. Regulated expression and effect of galectin-1 on Trypanosoma cruzi-infected macrophages: Modulation of microbicidal activity and survival. **Infect Immun** 2001;69:6804-6812.

White NM, Masui O, Newsted D, Scorilas A, Romaschin AD, Bjarnason GA, Siu KW, Yousef GM. Galectin-1 has potential prognostic significance and is implicated in clear cell renal cell carcinoma progression through the HIF/mTOR signaling axis. Br **J Cancer.** 2014 Mar 4;110(5):1250-9.

WILSON TJ, FIRTH MN, POWELL JT, HARRISON FL. The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. **Biochemical Journal.** Vol. 261(3):847-852, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Organization Report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. Geneve: WHO, 2002.

WU YL., DING YP., GAO J, TANAKA Y., et al. Risk Factors and Primary Prevention trials of Type 1 diabetes. **International Journal of Biological Sciences**, Vol.9, N. 6, 666-679, 2013. doi: 10.7150/ijbs.661.

ANEXOS

ANEXO 01: Documento de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Participação do antígeno leucocitário humano-G (HLA-G) e da Galectina-1 (GAL-1) na fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 1", protocolo nº 15.1.636.60.2, sob a responsabilidade de Flávia Porto Pelá e Marcelo Dias Baruffique envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) *ad referendum* em 30/09/2015.

Vigência do Projeto	20/09/2015 a 20/09/2016	
Espécie/Linhagem	Camundongo isogênico BALB/C	*Gallus gallus domesticus*
Nº de animais	06	03
Peso	20-25 g	1,4 – 1,6 kg
Sexo	Fêmea	Fêmea
Origem	Biotério da FCFRP-USP	Criadouro de galinhas da FCAV da UNESP-Jaboticabal

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2015.

Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892

ANEXO 02: Documento de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

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

HC FMRP-USP RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2012

Ofício nº 3402/2012
CEP/MGV

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"MARCADORES TRANSCRICIONAIS DE PREDIÇÕES DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS NO DIABETES MELLITUS"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 354ª Reunião Ordinária realizada em 24/09/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – paciente e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle,** de acordo com o Processo HCRP nº 12541/2012.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

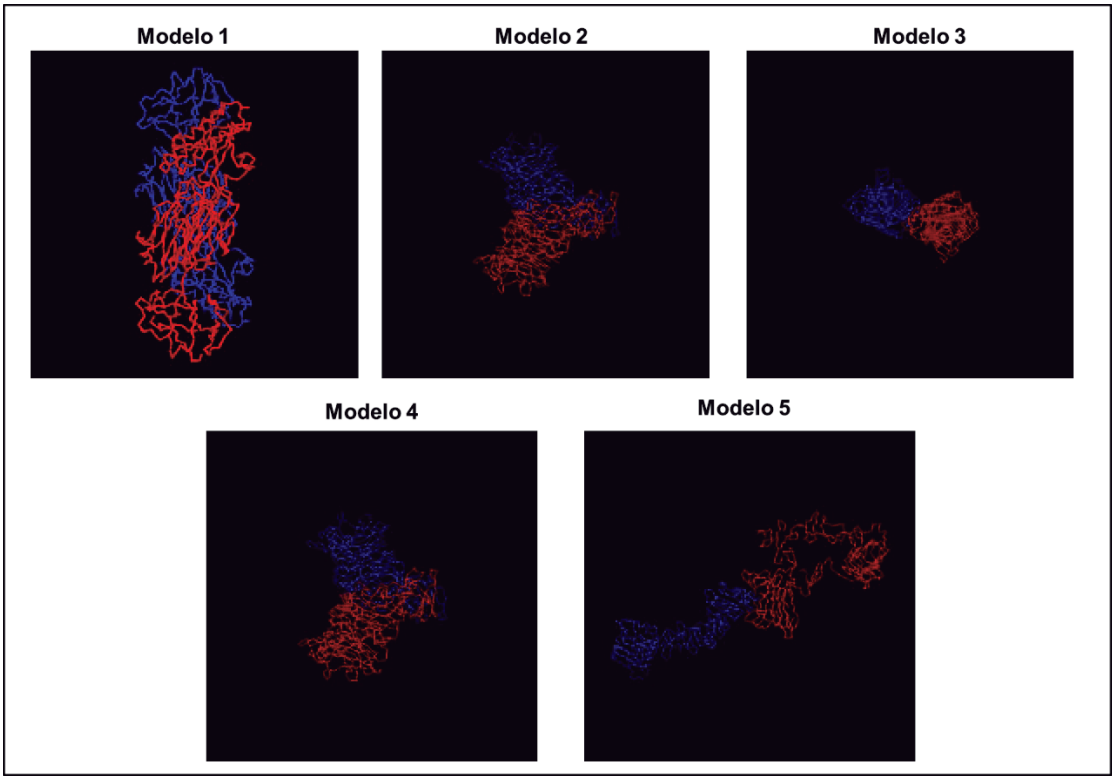
Atenciosamente.

Marcia Villanova

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

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. EDUARDO ANTÔNIO DONADI
Depto. de Clínica Médica

ANEXO 03: Predição da estrutura complexa do rhHLA-Gproteína-proteína por rearranjo multimérico a partir da sequência da proteína recombinante.



Fonte: Mukherjee S. & Zhang Y., 2011.