UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JÚLIA TEIXEIRA COTTAS DE AZEVEDO

Avaliação da função tímica em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Ribeirão Preto - 2013

JÚLIA TEIXEIRA COTTAS DE AZEVEDO

Avaliação da função tímica em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Kelen C. R. Malmegrim de Farias

Ribeirão Preto - 2013

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.

De Azevedo, Júlia Teixeira Cottas
Avaliação da função tímica em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas – Ribeirão Preto/2013.

170 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada
Orientador: Profa. Dra. Kelen C. R. Malmegrim de Farias

1. *Diabetes mellitus* tipo 1. 2. Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas. 3. Reconstituição imunológica. 4. Timo. 5. Receptor de célula T. 6. CDR3. 7. TREC

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÚLIA TEIXEIRA COTTAS DE AZEVEDO

Avaliação da função tímica em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Assinatura_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Assinatura_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Ao meu "anjo" protetor conhecido, nessa vida, como Giba
e ao grande mestre Dr. Júlio César Voltarelli

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida.

Aos meus queridos pais, Cássio e Maria, por toda força e incentivo que têm me dado em todos os momentos da minha vida e, acima de tudo, por acreditarem em minha força e capacidade. À Gabriela, que mais do que minha irmã é meu exemplo de força e dedicação e que me motivou a vencer todas as dificuldades durante esse caminho.

À querida Maria Lúcia por cuidar de mim em todos os dias da minha vida e a todos meus familiares que sempre me apoiaram incondicionalmente. Especialmente à minha tia Ana que, de uma forma ou de outra, sempre foi a que mais entendeu os caminhos escolhidos por mim; e à minha tia Luciana e à minha prima Juliana por me acolherem como filha e tornarem minha vida em Ribeirão Preto mais leve e segura.

Aos meus amigos de longas datas Anna Carolina, Talita (Tita), Marcel, Kamila, Natália (Nega), Clayton e Sandro que mesmo distantes nunca deixaram de me apoiar.

Aos amigos de não tão longas datas, porém não menos importantes por isso, Cíntia, Sabrina (Sasá), Laura (Laka), Livea, Nayara, Luísa, Letícia, Leonardo (Timão), Rafael (Mestre), Rafael (Curumim), Raphael (Panda) e André (Piffer). Agradeço em especial ao Diógenes pelas horas de conversa nos momentos difíceis, pelas risadas, pelos conselhos, pelo carinho e amor e pela amizade sincera e verdadeira; e à Maria Izabel que há três anos divide comigo minhas preocupações, minhas aflições e minhas alegrias, tornando meus dias mais leves e divertidos.

Aos meus companheiros de laboratório Juliana Ueda, Carolina Caliari, Lucas Coelho, Mariana Davanso, Rosane Bolzoni, Amanda Mizukami, Rafael Biaggio, Robson Amaral e Mário Soares Neto. Agradeço em especial à Gislane de Oliveira, minha grande companheira, protetora e mestre, pelos ensinamentos e pela amizade sincera em todos os momentos; e ao Kalil de Lima (Jovem), o irmão “adotivo” que a vida me deu, pelo seu jeito todo carinhoso de me ouvir e de me apoiar em todas as etapas do meu caminho.

Aos pacientes e aos controles saudáveis, que foram imprescindíveis para a realização desse projeto.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias pelo apoio, atenção, preocupação, compreensão e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Júlio César Voltarelli pela oportunidade de ter feito parte do seu grupo de pesquisa e por nos ensinar, da forma mais humilde e simples, o verdadeiro valor da pesquisa.

À Dra. Maria Carolina, ao Dr. Eduardo Couri, à Dra. Belinda Simões e ao Prof. Dr. Eduardo Donadi pela ajuda e colaboração.

À Profa. Dra. Luiza Guilherme e à Nathália Moreira Santos por terem ensinado a técnica de sequenciamento *TCRBV CDR3 Length Spectratyping* e nos ajudado a padronizá-la na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

À diretoria científica e administrativa da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

À Dra. Simone Kashima Haddad pelo espaço cedido e a todos os funcionários e colegas do Laboratório de Biologia Molecular. Em especial à Eva, Tathi e Mayra pela ajuda e apoio.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior pelo espaço cedido e a todos os funcionários do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, sobretudo à Cris Aires e à Adriana Marques que foram muito importantes para a realização desse trabalho.

À equipe de enfermagem da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial à Marcela, pelo auxílio nas coletas de sangue dos controles sadios.

Aos funcionários da limpeza e da copa da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto por sempre nos acolher muito bem, principalmente aos finais de semana.

Aos funcionários da biblioteca Rodrigo, Guilherme, Mônica e Marjory e às tradutoras Fernanda Udinal e Alessandra Almeida pela disposição e compreensão.

À Dalvinha pelo apoio e pelos conselhos;

À Ana, secretária da pós-graduação, pela paciência e dedicação.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do procedimento da terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH utilizado nos pacientes com DM-1 na unidade de TMO do HCFMRP-USP. 29

Figura 2. Representação esquemática do método TCRBV CDR3 Spectratyping e os padrões de distribuição da região CDR3 após a análise no software Gene Mapper™. 42

Figura 3. Número de moléculas de TREC em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios e dos pacientes com DM-1 antes do TACTH..... 49

Figura 4. Número de moléculas de TREC em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após o TACTH..... 50

Figura 5. Número de moléculas de TREC em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após TACTH..... 51

Figura 6. Diversidade do receptor da célula T (*complexity score*) dos indivíduos sadios e dos pacientes com DM-1 antes do TACTH..... 52

Figura 7. Diversidade do receptor da célula T (*complexity score*) dos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após o TACTH. 53

Figura 8. Diversidade do receptor da célula T (*complexity score*) dos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após o TACTH. 54

Figura 9. Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T do sangue periférico do paciente PMR (DM8) pré e pós-TACTH. 59

Figura 10. Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T do sangue periférico do paciente FCC (DM2) pré e pós-TACTH. 63

Figura 11. Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T do sangue periférico do indivíduo sadio JTCA (controle 4). 64

Figura 12. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 antes do TACTH..... 77

Figura 13. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+180 pós-TACTH. período D+180 78

Figura 14. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+360 pós-TACTH..... 78

Figura 15. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+720 pós-TACTH..... 79

Figura 16. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+1080 pós-TACTH..... 79

Figura 17. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+1440 pós-TACTH..... 80

Figura 18. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+1800 pós-TACTH..... 80

Figura 19. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+180 pós-TACTH..... 81

Figura 20. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+360 pós-TACTH..... 81

Figura 21. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+720 pós-TACTH..... 82

Figura 22. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+1080 pós-TACTH..... 82

Figura 23. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+1440 pós-TACTH..... 83

Figura 24. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+1800 pós-TACTH..... 84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos *primers* e da sonda do gene TREC..... 35

Tabela 2. Sequências dos *primers* e da sonda do gene Albumina..... 35

Tabela 3. Sequencia dos *primers* utilizados na amplificação das famílias Vβ do TCR. 37

Tabela 4. Tamanho esperado do produto de PCR da amplificação Vβ-Cβ (em pares de bases) para o segmento CDR3 de 10 aminoácidos..... 39

Tabela 5. Características clínico-demográficas dos pacientes com DM-1 no período pré-transplante e a avaliação da resposta clínica após a terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH..... 47

Tabela 6. Peptídeo C dos pacientes com DM-1 antes e diversos períodos após o TACTH..... 48

Tabela 7. Análise da diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH. 72

Tabela 8. Análise da diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH. 73

Tabela 9. Análise da diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH. 74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 2

1.1 Doenças autoimunes 2

1.2 *Diabetes mellitus* tipo 1 3

1.2.1 Imunopatologia do DM-1 7

1.2.2 Tratamento do DM-1 9

1.3 Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas para doenças autoimunes 12

1.4 Reconstituição imunológica após o transplante de células-tronco hematopoéticas 16

1.4.1 Reconstituição timo-dependente e *T cell receptor excision circles* 18

1.5 Receptor de células T e reconstituição do repertório de células T após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas 19

1.6 Justificativa e Hipótese do estudo 22

2 OBJETIVOS 25

2.1 Objetivo Geral 25

2.2 Objetivos específicos 25

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 27

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS 28

4.1 Pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e controles 28

4.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico 30

4.3 Extração de DNA das células mononucleares 31

4.4 Extração de RNA 31

4.5 Eletroforese de RNA em gel de agarose 1% 32

4.6 Transcrição reversa 32

4.7 Validação da transcrição reversa 33

4.8 PCR em tempo real para a quantificação absoluta de TRECs 33

4.9 Método de TCRBV CDR3 *Spectratyping* 35

4.9.1 Reação de PCR (Vβ-Cβ) para determinação das famílias Vβ do TCR 36

4.9.2 Reação de elongação 37

4.9.3 Preparo das amostras e aplicação no sequenciador automático 38

4.9.4 Perfil e cálculo do tamanho da região CDR3 do TCR e da frequência das famílias Vβ pelo método de *TCRVB CDR3 Spectratyping* 38

4.10 Análise Estatística 42

5 RESULTADOS 45

5.1 Resposta clínica dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 após o tratamento com AID/TACTH 45

5.2 Quantificação absoluta do gene TREC em células mononucleares isoladas de sangue periférico 48

5.3 Análise do repertório de células T dos pacientes com DM-1 antes e após o TACTH e de indivíduos sadios 51

5.3.1 *Complexity Score* 51

5.3.2 Perfil de distribuição dos segmentos de CDR3 das famílias Vβ do TCR 54

5.3.3 Análise da diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH 65

5.3.3.1 Grupo de pacientes que ficaram livres de insulina por período menor que três anos pós-transplante 66

5.3.3.2 Grupo de pacientes que ficaram livres de insulina por período maior ou igual a 3 anos pós-transplante 68

5.3.3.3 Grupo de pacientes que não responderam ao transplante 70

5.3.4 Padrões de reconstituição das famílias Vβ após TACTH 75

5.3.5 Frequências das famílias Vβ nos pacientes com DM-1 submetidos ao TACTH 76

5.4 Correlação entre os níveis de TRECs, a complexidade do repertório de células T e os níveis de peptídeo-C de pacientes com DM-1 84

6 DISCUSSÃO 86

6.1 Produção tímica de células T *naive* nos pacientes com DM-1 antes e após o tratamento com IAD seguida pelo TACTH 86

6.2 Diversidade do repertório de células T nos pacientes com DM-1 antes e após o tratamento com IAD seguida pelo TACTH 90

6.3 Frequências das famílias Vβ nos pacientes com DM-1 antes e após o TACTH 92

6.4 Reconstituição do repertório de células T após o TACTH 94

6.5 Considerações finais 98

7 CONCLUSÕES 100

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 103

9 APÊNDICES 126

10 ANEXOS 148

RESUMO

DE AZEVEDO, J.T.C. **Avaliação da função tímica em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.** 2013. 170f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O *diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) é uma doença autoimune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva das células β pancreáticas produtoras de insulina. A imunossupressão em altas doses seguida do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) constitui uma alternativa terapêutica recente e promissora para o DM-1 recém-diagnosticado, impedindo a progressão da destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina e induzindo independência insulínica por um período prolongado na maioria dos pacientes. O princípio dessa terapia baseia-se na eliminação das células autorreativas pela imunossupressão intensa e na reconstituição de um sistema imunológico novo e tolerante após o transplante. Com o objetivo de avaliar a função do timo e sua contribuição na geração do repertório de células T nos pacientes com DM-1 após o TACTH, nesse trabalho foram avaliados os níveis de *T cell receptor excision circles* (TRECs) em células T do sangue periférico e a diversidade do repertório de células T dos pacientes com DM-1 (n=23) antes e em diversos períodos após o transplante. A quantificação absoluta dos níveis de TRECs (número de moléculas de TRECs/100g de DNA) foi realizada pela técnica de PCR em tempo real e a avaliação do repertório de células T foi realizada pela técnica de *TCRBV CDR3 Spectratyping*. Dentre os vinte e três pacientes, vinte alcançaram a independência insulínica por períodos variáveis de tempo e três não responderam ao tratamento. Não foi observada a restrição do repertório de células T nos pacientes com DM-1 no período pré-transplante, ou seja, quando recém-diagnosticados. Foram identificadas cinco famílias Vβ (7, 18, 19, 20 e 22) em expansão clonal nos pacientes com DM-1. As famílias Vβ 7, 18, 19, 20 apresentaram-se em expansão clonal antes do transplante e se mantiveram com frequência elevada após o transplante, enquanto a família Vβ 22 apresentou aumento da frequência somente nos períodos mais tardios após o transplante. Nos primeiros meses após o transplante, houve redução do número de moléculas de TRECs e restrição do repertório de células T. Contudo, um ano após o

transplante, o número de moléculas de TRECs atingiram valores normais e o repertório de células T apresentou-se com ampla diversidade. Nossos resultados mostraram que o TACTH foi capaz de induzir mudanças na composição do repertório de células T dos pacientes com DM-1 após a terapia de IAD/TACTH, evidenciadas por alterações qualitativas e quantitativas dos picos de CDR3 do TCR, sugerindo a reconstituição de um repertório de células T diverso até dois anos pós-transplante. Embora tenha ocorrido reativação da função tímica após o transplante, evidenciada pelo aumento dos níveis de TRECs de um ano e meio a cinco anos pós-transplante, a diversidade do repertório das células T diminuiu a partir de dois anos e meio pós-transplante, sugerindo uma reconstituição tímica *de novo* de células T *naive* que expressam preferencialmente algumas cadeias Vβ. Estas evidências imunológicas poderiam explicar a melhora clínica (independência insulínica) temporária observada na maioria dos pacientes após a terapia de IAD/TACTH.

Palavras chaves: *Diabetes mellitus* tipo 1; Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas; Reconstituição imunológica; Timo; Receptor de célula T; CDR3; TREC.

ABSTRACT

DE AZEVEDO, J.T.C. **Evaluation of thymic function in type 1 *diabetes mellitus* patients following autologous hematopoietic stem cell transplantation.** 2013. 170f. School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Type 1 *diabetes mellitus* (T1D) is an organ-specific autoimmune disease characterized by insulin-producing β pancreatic cell destruction. High-dose immunosuppression followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) is a recent and promising therapeutic approach for treatment of T1D, preventing the progress of destruction of pancreatic β cells and inducing insulin independence for a prolonged period in most patients. The rationale of the AHSCT is based on the elimination of autoreactive cells by the intense immunosuppression and on the reconstitution of a new and tolerant immune system after transplantation. Aiming at assessing the thymic role in the production of new T cell repertoire in T1D patients after AHSCT, in this study was evaluated the levels of T cell receptor excision circles (TRECs) in T cells of peripheral blood as well as the clonality and diversity of T cell repertoire in T1D patients (n=23) before and several periods after transplantation. The absolute quantification of TRECs levels (number of molecules of TRECs/100ng of DNA) was performed by real-time PCR and the analysis of T cell repertoire was performed by TCRBV CDR3 Spectratyping. Among the twenty-three patients, twenty achieved insulin independence for variable periods and three did not respond to the treatment. The T cell repertoire in T1D patients was not restricted in pre-transplantation, i.e., when newly diagnosed. It was identified five Vβ families (7, 18, 19, 20 e 22) in the clonal expansion in T1D patients. The Vβ families 7, 18, 19, 20 were in clonal expansion before transplantation and maintained with high frequency after transplantation, whereas the Vβ 22 family increased its frequency only in the later periods after transplantation. It was observed that the numbers of molecules of TRECs decreased and the T cell repertoire was restricted in the early months after transplantation. However, the levels of TRECs were normalized and the T cell repertoire showed diversity one year after transplantation. Our results indicate that AHSCT was able to induce changes in the composition of the T cell repertoire of patients after AHSCT, evidenced by qualitative and quantitative changes in the composition of T-cell receptor β-chain CDR3 peaks, suggesting the reconstitution of diverse T cell repertoire up to two years after transplantation. Although there was

reactivation of thymic function after transplantation, as evidenced by increased levels of TRECs from one and a half year to five years after transplantation, the diversity of the T cells repertoire decreased from two and a half years after transplantation, suggesting a reconstruction of new naive T cells that preferentially express some Vβ chains. These immunological evidences could explain the temporary clinical improvement (insulin independence) observed in most patients after IAD / AHSCT therapy.

Keywords: Type 1 *Diabetes mellitus*; Autologous hematopoietic stem cell transplantation; Immune reconstitution; Thymus; T cell receptor; CDR3; TREC.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIRE – do inglês “autoimmune regulator”
- APC - do inglês “*antigen presenting cell*” ou célula apresentadora de antígeno
- APS-1 - síndrome poliendócrina autoimune do tipo 1
- ATG - do inglês “*anti-thymocyte globulin*” ou globulina anti-linfocitária
- CDR - do inglês “*Complementarity Determining Region*” ou região determinadora de complementaridade
- CS – do inglês “*complexity score*”
- CTHs – células-tronco hematopoéticas
- CTLA-4 - do inglês “*citotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*”, ou molécula 4 associada ao linfócito T citotóxico
- DAIs - Doenças autoimunes
- DEPC - dietilpirocarbonato
- DM-1 - *Diabetes mellitus* tipo 1
- DM-1≥3anos - pacientes livres de insulina por período maior ou igual a 3 anos
- DM-1<3anos - pacientes livres de insulina por período menor que 3 anos
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DNA - do inglês “*desoxiribonucleic acid*” ou ácido desoxirribonucleico
- dNTPs- do inglês “*desoxiribonicleotide triphosphates*” ou desoxirribonucleotídeos fosfatados
- EDTA - do inglês “*ethylenediamine tetraacetic acid*” ou ácido tetra-acético etilenodiamina
- EM - esclerose múltipla
- FOXP3 – do inglês “*forkhead box P3*”
- GAD - ácido glutâmico descarboxilase
- G-CSF - do inglês “*granulocyte-colony stimulating factor*” ou fator estimulador de colônias de granulócitos
- GVHD – do inglês “Graft-versus-host disease” ou doença do enxerto *versus* hospedeiro
- HLA - do inglês “*Human Leukocyte Antigens*” ou antígenos leucocitários humanos

- Hsp60 - do inglês "*Heat shock protein 60*" ou proteína de choque térmico de 60 KDa
- IA-2 - proteína tirosina fosfatase
- IAD - imunossupressão em alta dose
- ICA-1 - do ingles "*islet cell autoantigen 1"*
- IF1H1 - do inglês "*Interferon-induced helicase 1"*
- IFN-γ - do inglês "*gamma interferon*" ou interferon gama
- IGRP - do inglês "*Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*"
- IIT - terapia intensiva com insulina
- IL – interleucina
- IPEX - do inglês "*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*" ou síndrome de imunodesregulação, poliendocrinopatia, enteropatia, ligada ao X
- iTregs – células T reguladoras induzidas
- LES - lúpus eritematoso sistêmico
- LIP - do inglês "*lymphopenia induced proliferation"*ou proliferação induzida por linfopenia
- LYP - tirosina fosfatase linfoide
- MHC - do inglês "*Major Histocompatibility Complex*" ou Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NOD – do inglês "*non obese diabetic*" ou diabético não-obeso
- NK - células *"natural killer"*
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PBMCs - células mononucleares do sangue periférico
- PBS - do inglês "*phosphate buffer saline*", ou tampão salina fosfato
- PCR - do inglês "*polymerase chain reaction*" ou reação de polimerização em cadeia
- Pré-mob - pré-mobilização
- RNA – do inglês "*ribonucleic acid*" ou ácido ribonucleico
- TA - temperatura ambiente
- TACTH - Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas
- TCR - inglês "*T cell receptor*", ou receptor de célula T

- TCTH - Transplante de células-tronco hematopoéticas
- TGF-β – do inglês *"Transforming growth fator beta"* ou fator de crescimento transformante beta
- Th - T "*helper*" - células T auxiliadoras
- TNF-α - do inglês "*tumor necrosis factor alpha*" ou fator de necrose tumoral alfa
- TREC - do inglês *"T cell receptor excision circles"* ou círculos de excisão do receptor da célula T
- Treg - célula T reguladora
- VNTRs - do inglês "*Variable Number of Tandem Repeats"* ou número variável de repetições em tandem
- ZnT8 - transportador de zinco 8

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Doenças autoimunes

As doenças autoimunes (DAIs) constituem um grupo complexo e heterogêneo de doenças que atingem de 3 a 8% da população mundial, acometendo principalmente mulheres (Jacobson *et al.*, 1997; Cooper e Stroehla, 2003; Farge *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2012). Trata-se de doenças que resultam do reconhecimento de antígenos próprios pelo sistema imunológico ocasionando lesão tecidual (Davidson e Diamond, 2001; Marrack, Kappler e Kotzin, 2001; Kunz e Ibrahim, 2009).

As DAIs podem ser classificadas em órgão-específicas ou sistêmicas (Davidson e Diamond, 2001; Marrack, Kappler e Kotzin, 2001). As doenças órgão-específicas são caracterizadas por lesões imunomediadas em um órgão ou tecido específico. Exemplos destes são as células β pancreáticas em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e as células produtoras de mielina no sistema nervoso central em pacientes com esclerose múltipla. Em DAIs sistêmicas, observam-se reações autoimunes contra diversos órgãos e tecidos, o que promove o aparecimento de lesões generalizadas e formação de imuno-complexos, como no lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (Maas *et al.*, 2002).

As DAIs desenvolvem-se quando linfócitos autorreativos escapam dos mecanismos de tolerância imunológica central e/ou periférica e são ativados na periferia (Rioux e Abbas, 2005). Embora os mecanismos pelos quais ocorre a quebra da tolerância imunológica e o desenvolvimento de DAIs ainda não estejam completamente esclarecidos, acredita-se que essas doenças resultem de uma interação entre vários fatores desencadeantes, tais como fatores genéticos e ambientais, bem como defeitos nos processos de imunorregulação (Rioux e Abbas, 2005).

A complexidade genética das DAIs dificulta a caracterização dos genes envolvidos na sua patogênese, porém o grupo dos genes do MHC mostra clara relação com essas doenças (Bogdanos *et al.*, 2012).

As baixas taxas de concordância para as DAIs entre gêmeos idênticos sugerem uma contribuição fundamental de fatores ambientais para o desenvolvimento da autoimunidade. Dentre os fatores ambientais possivelmente envolvidos no desenvolvimento das DAIs estão os agentes infecciosos, as alterações de níveis hormonais e a dieta (Davidson e Diamond, 2001; Rioux e Abbas, 2005).

A maioria das DAIs são mais frequentes em mulheres do que em homens, sugerindo que diferenças genéticas e diferenças na produção de hormônios sexuais podem estar envolvidas no desenvolvimento dessas patologias (Fish, 2008; Libert, Dejager e Pinheiro, 2010).

O tratamento convencional de DAIs é feito pelo uso de drogas imunossupressoras, as quais inibem e/ou bloqueiam de forma inespecífica a ativação de linfócitos T e B, inclusive a dos linfócitos autorreativos. Um tratamento mais recente, alternativo e promissor é a indução da tolerância imunológica pela terapia de imunossupressão em altas doses seguida pelo transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH) (Sykes e Nikolic, 2005; Tyndall e Saccardi, 2005; Farge *et al.*, 2010).

1.2 *Diabetes mellitus* tipo 1

O *diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) é uma doença autoimune órgão-específica resultante da ação conjunta de fatores ambientais e genéticos. É uma doença caracterizada pela destruição seletiva das células β pancreáticas produtoras de insulina por mecanismos autoimunes (Kukreja e Maclaren, 1999; Knip e Siljander, 2008; Ruffner e Robbins, 2010; Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011; Schneider, Kretowicz e Von Herrath, 2012).

O DM-1 é frequentemente diagnosticado em crianças e adolescentes, apresentando, sobretudo, três sintomas básicos: a polidipsia (sede excessiva), poliúria (aumento do volume urinário) e polifagia (fome excessiva) (Atkinson, 2012). Indivíduos com DM-1 também apresentam altos níveis de glicose no sangue, o que pode levar a complicações graves, como cetoacidose, cegueira, insuficiência renal, doença cardíaca e úlceras crônicas (Barclay *et al.*, 2010; Jenkins *et al.*, 2010; Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011).

Trata-se de uma das doenças crônicas mais comuns na infância e o número de pacientes com DM-1 tem crescido nos últimos tempos, sendo crianças, adolescentes e adultos jovens de origem caucasiana os mais atingidos (Gale, 2005; Gillespie, 2006; Voltarelli *et al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de pacientes diabéticos no mundo era de 347 milhões de indivíduos no ano de 2012, sendo que aproximadamente 10% desse total eram pacientes com DM-1.

Vários genes estão associados ao desenvolvimento do DM-1 e raramente mutações em um único gene são responsáveis pelo desenvolvimento da doença. Mutações em um único gene, quando presentes, estão envolvidas não só no desenvolvimento do DM-1, mas também no desencadeamento de múltiplas outras DAIs (Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011). Por exemplo, na síndrome de imunodesregulação, poliendocrinopatia, enteropatia, ligada ao X (IPEX), na qual mutações no gene codificador de Foxp3 leva à disfunção de células T reguladoras (Tregs), cerca de 80% das crianças afetadas desenvolvem o DM-1 (Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011). Já na síndrome poliendócrina autoimune do tipo 1 (APS-1), mutações no gene codificador do AIRE (*autoimune regulator*) desencadeiam condições autoimunes severas e cerca de 20% dos pacientes desenvolvem DM-1 (Villaseñor, Benoist e Mathis, 2005; Bluestone, Herold e Eisenbarth, 2010).

Estudos indicam que a região do HLA no cromossomo 6p21, também chamada de IDDM1, é de grande importância para o desenvolvimento do DM-1. Vários alelos na região do HLA de classe II estão associados à suscetibilidade e à proteção ou resistência ao DM-1, porém essa predisposição genética não é suficiente para o desenvolvimento da doença (Narendran, Estella e Fourlanos, 2005; Gillespie, 2006; Eisenbarth, 2007).

Os dois principais haplótipos que conferem suscetibilidade a doença são os DR3-DQ2 (HLA-DRB1*03/DQA1*0501/DQB1*0201) e o DR4-DQ8 (HLA-DRB1*04 /DQA1*0301/ DQB1*0302), os quais estão presentes em aproximadamente 95% dos pacientes caucasianos. Destes, 55% a 60% são heterozigotos para DR3/DR4, o que aumenta o risco de desenvolvimento do diabetes (Pociot e Mcdermott, 2002; Knip e Siljander, 2008; Silva e Dib, 2008; Lernmark e Larsson, 2013).

O haplótipo DQA1*0102/DQB1*0602/DRB1*1501 é o mais comum entre os caucasianos e confere proteção contra o desenvolvimento do DM-1, porém o mecanismo pelo qual o haplótipo atua ainda não está claro (Badenhoop *et al.*, 1995).

Outra região gênica que confere grande predisposição ao desenvolvimento do DM-1 é o *locus* IDDM2 no cromossomo 11, o qual contém o gene da insulina. Estudos de mapeamento genético indicam que a suscetibilidade ao desenvolvimento da doença reside em VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) presentes na região promotora do gene da insulina, sendo que a magnitude do risco correlaciona-se com o número de VNTRs (Bennett *et al.*, 1995; Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011).

Outros genes relacionados ao DM-1 são o gene PTPN22 que codifica a tirosina fosfatase linfoide (LYP), o gene codificador da molécula inibitória CTLA-4 na região

IDDM12 e o gene codificador da cadeia α do receptor de IL-2 (Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011).

Recentemente, estudos mostraram que polimorfismos na região do gene IF1H1 (*Interferon-induced helicase 1*) também se relacionam com o DM-1. IF1H1 codifica a helicase 1, a qual funciona como um sensor citoplasmático que reconhece o RNA de dupla fita de vários vírus. A helicase 1 tem grande importância na produção de interferons do tipo 1 em respostas a infecções virais como, por exemplo, nas infecções por Coxsackievirus (um enterovírus bastante relacionado com o desenvolvimento do DM-1) (Kato *et al.*, 2006; Meylan, Tschopp e Karin, 2006). Defeitos genéticos em IF1H1 poderiam afetar a detecção e eliminação de infecções virais, muitas vezes desencadeando uma resposta imunológica exacerbada contra os vírus e consequente reação cruzada com antígenos das células β pancreáticas e destruição das mesmas (Smyth *et al.*, 2006; Coppieters, Wiberg e Von Herrath, 2012).

Os fatores ambientais relacionados a essa doença são infecções virais, dieta na infância, vacinação, influências climáticas, toxinas e estresse, os quais podem promover ou atenuar a patogênese do DM-1 (Knip e Akerblom, 1999; Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011).

Os vírus mais conhecidos que estão relacionados com o DM-1 são os enterovírus e o vírus da rubéola (Atkinson *et al.*, 1994; Hiemstra *et al.*, 2001; Härkönen *et al.*, 2002; Gillespie, 2006; Honeyman *et al.*, 2010). De modo geral, os mecanismos pelos quais os vírus podem desencadear ou acelerar a autoimunidade incluem: toxicidade direta (vários vírus são capazes de infectar as células produtoras de insulina do pâncreas), reação cruzada entre antígenos virais e de células β pancreáticas (mimetismo antigênico), produção de superantígenos (ativação de clones de células T autorreativas) e ativação inespecífica do sistema imunológico (a infecção viral promove um microambiente inflamatório por meio da indução da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias; *bystander activation*) (Coppieters, Wiberg e Von Herrath, 2012).

Em relação à dieta na infância, tem sido relatado que a albumina sérica bovina, uma proteína constituinte do leite de vaca, também parece estar envolvida no desenvolvimento do DM-1. Esta possui uma sequência de aminoácidos semelhante à ICA-1 (*islet cell autoantigen 1*) (uma proteína de 69 kDa presente na superfície das células β pancreáticas) e, portanto, anticorpos contra essa região da albumina poderiam apresentar uma reação cruzada contras as células β (Karjalainen *et al.*, 1992; Karlsson e Ludvigsson, 2000).

Por outro lado, estudos indicam que os níveis de metabólitos derivados da vitamina D são menores no plasma de pacientes com diabetes e que o aumento da ingestão de vitamina D reduz a incidência do DM-1 tanto em camundongos como em humanos. Portanto, acredita-se que a vitamina D apresenta propriedades protetoras no desenvolvimento do DM-1, uma vez que essa vitamina é capaz de inibir a diferenciação de células dendríticas e a ativação de respostas imunológicas (Mathieu *et al.*, 2005; Littorin *et al.*, 2006).

Vários autoantígenos envolvidos na patogênese do DM-1 já foram descritos e dentre eles estão: peptídeos derivados da insulina, isoforma de 65 kDa do ácido glutâmico descarboxilase (GAD65), proteína tirosina fosfatase (IA-2), proteína hsp60 (*Heat shock protein 60*), IGRP (*Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*) e transportador de zinco 8 (ZnT8) (Mathis, Vence e Benoist, 2001; Lieberman *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Zanin-Zhorov *et al.*, 2006; Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011).

Embora ainda controversos, estudos recentes demonstram que apesar desses vários autoantígenos estarem envolvidos na patogênese do DM-1, respostas imunológicas contra os peptídeos derivados da insulina parecem ser essenciais para o desenvolvimento da doença e são considerados os autoantígenos iniciadores do DM-1, tanto em animais como em humanos (Kent *et al.*, 2005; Von Herrath, 2005; Mallone, Brezar e Boitard, 2011; Nakayama, 2011). Em humanos, foi visto que anticorpos contra a insulina são frequentemente detectados anteriormente aos anticorpos contra GAD, IA-2/IA-2β e ZnT8 (Yu *et al.*, 2000; Achenbach *et al.*, 2004; Mallone, Brezar e Boitard, 2011; Nakayama, 2011).

Os anticorpos contra esses autoantígenos vêm sendo utilizados para diagnosticar a doença, já que a progressão clínica do diabetes está diretamente relacionada à presença e níveis séricos dos autoanticorpos (Knip e Siljander, 2008; Lernmark e Larsson, 2013). Em um estudo feito com parentes não diabéticos de pacientes com DM-1, foi mostrado que a porcentagem de risco para o desenvolvimento da doença está relacionada com a presença de autoanticorpos, sendo de 60% para anti-GAD65, 54% para anti-IA2 e 34% para IA2-β (Kukreja e Maclaren, 1999; Maclaren *et al.*, 1999; Silva e Dib, 2008).

1.2.1 Imunopatologia do DM-1

O DM-1 é uma doença mediada principalmente por células T, que constituem a maioria das células infiltradas nas ilhotas pancreáticas de animais diabéticos. Foi observado que camundongos NOD (*non obese diabetic*) sem timo ou com baixos níveis de células T não desenvolveram o diabetes, enquanto os animais saudáveis que receberam células T de camundongos diabéticos desenvolveram a doença (Mathis, Vence e Benoist, 2001). As células T envolvidas no desenvolvimento do DM-1 são tanto células $CD4^+$ como $CD8^+$, as quais são capazes de reconhecer antígenos expressos nas células β das ilhotas pancreáticas (Mathis, Vence e Benoist, 2001; Bluestone, Herold e Eisenbarth, 2010; Csorba, Lyon e Hollenberg, 2010).

Entretanto, outros componentes celulares do sistema imunológico também estão envolvidos no desenvolvimento do DM-1, como células B, macrófagos, células dendríticas e células NK. (Mathis, Vence e Benoist, 2001; Bluestone, Herold e Eisenbarth, 2010; Csorba, Lyon e Hollenberg, 2010; Lehuen *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2010; Bettini e Vignali, 2011).

O DM-1 pode ser dividido em duas fases, a insulite e o diabetes propriamente dito. No estágio precoce da doença (insulite), monócitos/macrófagos, células dendríticas, células NK e linfócitos T e B infiltram nas ilhotas pancreáticas e causam a destruição das células β produtoras de insulina. A destruição das células β por esses linfócitos autorreativos infiltrados pode ocorrer por anos sem ser detectada (Itoh *et al.*, 1993; Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011). Em humanos, foi recentemente demonstrada a presença de células T $CD8^+$ autorreativas, específicas para antígenos das células β pancreáticas, em biópsias de pâncreas (Coppieters *et al.*, 2012). Na segunda fase (endócrina; diabetes propriamente dito), a maioria das células β pancreáticas já se encontra destruída e a insulina produzida não é suficiente para regular os níveis de glicose no sangue (Gillespie, 2006; Eisenbarth, 2007; Knip e Siljander, 2008).

O diabetes tem início quando autoantígenos específicos das células β são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells* - APCs) aos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ autorreativos presentes no linfonodo pancreático. Uma vez ativadas, essas células migram para o pâncreas, onde desencadeiam suas funções efetoras (Mathis, Vence e Benoist, 2001; Lehuen *et al.*, 2010; Codina-Busqueta *et al.*, 2011). A destruição das células β produtoras de insulina mediada pelas células T $CD8^+$ é, provavelmente, o principal mecanismo de destruição e envolve tanto liberação

de grânulos citotóxicos contendo granzima e perforina pelas células T $CD8^+$, como interação dependente de Fas-FasL (Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011).

Os linfócitos T $CD4^+$ também expressam FasL e, portanto, medeiam a apoptose de células β pancreáticas ao se ligarem as moléculas Fas expressas nas ilhotas inflamadas. Porém essas células atuam, principalmente, produzindo citocinas com efeitos tóxicos para as células β pancreáticas. Além disso, as células T $CD4^+$ induzem e direcionam a resposta imunológica de outras células efetoras, como os linfócitos T $CD8^+$ e células B (Kukreja e Maclaren, 1999; Csorba, Lyon e Hollenberg, 2010; Lehuen *et al.*, 2010; Roep e Peakman, 2011).

As células T $CD4^+$ ativadas produzem IFN-γ que estimula a produção de citocinas (tais como a IL-1β, IL-12 e TNF-α) e de radicais livres por macrófagos, substâncias tóxicas para as células β pancreáticas (Kukreja e Maclaren, 1999; Csorba, Lyon e Hollenberg, 2010; Lehuen *et al.*, 2010).

Paralelamente, as células T $CD4^+$ podem atuar diretamente sobre as APCs por meio da interação CD40-CD40L, ativando ainda mais essas células e, consequentemente, intensificando as respostas mediadas por linfócitos T $CD8^+$ (Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011).

Estudos recentes mostram que as células Th17 também podem estar envolvidas na patogênese do diabetes autoimune experimental e que pacientes com DM-1 apresentam aumento da frequência de células Th17 no sangue periférico (Mensah-Brown *et al.*, 2006; Martin-Orozco *et al.*, 2009; Honkanen *et al.*, 2010; Ryba-Stanisławowska *et al.*, 2013; Yaochite *et al.*, 2013). Acredita-se que as células Th17 estejam envolvidas no recrutamento de macrófagos para as ilhotas, promovendo inflamação exacerbada (Martin-Orozco *et al.*, 2009; Honkanen *et al.*, 2010).

Indivíduos com DM-1 também apresentam número reduzido de células T reguladoras (Tregs) naturais, as quais são responsáveis pela supressão das células efetoras envolvidas na doença (Chen *et al.*, 2005; Ryba-Stanisławowska *et al.*, 2013). Além das células Tregs naturais, vários estudos demonstram que células Tregs podem ser induzidas na periferia, são as chamadas células Tregs induzidas (iTregs), que também possuem capacidade imunossupressora. Dentre essa subpopulação de células Tregs, encontram-se as células Tr1 secretoras de IL-10 e as células Th3 produtoras de TGF-β (Maloy e Powrie, 2001; Sakaguchi *et al.*, 2010). A função das iTregs na patogênese do DM-1 ainda não é bem estabelecida, porém estudos em modelos animais

mostram que as iTregs são capazes de bloquear o desenvolvimento da doença (Petzold *et al.*, 2010; Heiber e Geiger, 2012).

As células NK são importantes produtoras de citocinas inflamatórias, como IL-12, IL-18 e IFN-γ, e também são encontradas nas ilhotas pancreáticas de animais diabéticos, onde pode ser observada uma relação inversa entre o número de células NK infiltradas e a severidade da doença (Csorba, Lyon e Hollenberg, 2010).

As células B atuam como APCs para as células T autorreativas (Yanaba *et al.*, 2008). A depleção de células B em camundongos NOD, antes do início da doença, diminui a insulite e previne o desenvolvimento do diabetes em cerca de 60% dos animais. Entretanto, a depleção após o início da doença apenas retarda a progressão do DM-1 e não possui caráter curativo, o que apenas sugere atenuação da ativação das células T autorreativas (Xiu *et al.*, 2008; Codina-Busqueta *et al.*, 2011).

1.2.2 Tratamento do DM-1

O DM-1 é rotineiramente tratado pela terapia convencional com insulina ou pela terapia intensiva com insulina (IIT) (Mellado-Gil, Cobo-Vuilleumier e Gauthier, 2012). Apesar dos resultados satisfatórios obtidos com o uso da insulina na maioria dos casos, não se trata de um tratamento curativo, já que a gênese da doença não é controlada e a resposta autoimune permanece. Além disso, em alguns casos, o controle glicêmico não é alcançado pelo uso exógeno da insulina e complicações decorrentes da hiperglicemia podem acontecer nesses pacientes (Huurman *et al.*, 2007; Lernmark e Larsson, 2013).

Outra opção terapêutica é o transplante de células β pancreáticas, que pode ser realizado tanto pelo transplante de pâncreas como pelo de ilhotas de Langerhans isoladas (White, Shaw e Sutherland, 2009; Vardanyan *et al.*, 2010). Contudo, várias complicações decorrentes da cirurgia são relatadas, como trombose, rejeição do enxerto ou recorrência da destruição autoimune das células β (Shapiro *et al.*, 2000; Sutherland, Gruessner e Gruessner, 2001; Ryan *et al.*, 2005; Huurman *et al.*, 2007; Boggi, Amorese e Marchetti, 2010; Gremizzi *et al.*, 2010). Além disso, o transplante de pâncreas e de ilhotas pancreáticas é limitado pelo pequeno número de doadores (Li *et al.*, 2009).

Com essa perspectiva, novas abordagens terapêuticas estão sendo desenvolvidas durante os últimos 20 anos, entretanto várias limitações ainda existem (Bluestone, Herold e Eisenbarth, 2010). Estudos preventivos, nos quais indivíduos com alta predisposição ao desenvolvimento do DM-1 são tratados com o objetivo de induzir a

tolerância imunológica aos autoantígenos das células β pancreáticas, ainda são pouco satisfatórios (Group, 2002; Nakayama, 2011; Lernmark e Larsson, 2013; Roep *et al.*, 2013).

Nesse sentido, a maioria das abordagens terapêuticas para o DM-1 é realizada após o diagnóstico da doença e, portanto, elas atuam no bloqueio da resposta imunológica contra autoantígenos e preservação da massa residual de células β pancreáticas (Bluestone, Herold e Eisenbarth, 2010; Lernmark e Larsson, 2013).

Dentre essas alternativas terapêuticas encontra-se regimes de immunossupressão, com medicamentos imunossupressores de ação inespecífica e sistêmica, tais como ciclosporina A, azatioprina e prednisona. Embora uma resposta terapêutica seja alcançada durante o tratamento com esses imunossupressores, estes são ineficazes na restauração da autotolerância. Além disso, o quadro de imunossupressão e a citotoxicidade observados durante o tratamento limita muito a indicação desses agentes para o tratamento do DM-1 (Stiller *et al.*, 1984; Silverstein *et al.*, 1988; Parving *et al.*, 1999).

O tratamento com diferentes anticorpos monoclonais anti-CD3, como o otelixizumab e teplizumab, também vem sendo realizado (Chatenoud e Bluestone, 2007; Chatenoud, 2010). Em um estudo clinico de fase II, o uso de otelixizumab manteve os níveis diários de insulina sem aumento por mais de 48 meses em pacientes com DM-1, contudo esses efeitos foram dependentes da idade e dos níveis residuais de peptídeo-C dos pacientes (Keymeulen *et al.*, 2005; Keymeulen *et al.*, 2010). Já nos pacientes tratados com teplizumab, foi observado o aumento de peptídeo-C e melhora dos parâmetros clínicos por aproximadamente 2 anos, porém vários efeitos adversos foram relatados (Herold *et al.*, 2002; Herold *et al.*, 2009).

Outros anticorpos monoclonais também estão sendo avaliados em estudos clínicos em pacientes com DM-1, como o rituximab e abatacept (Lernmark e Larsson, 2013). Apesar do DM-1 ser considerado uma doença mediada principalmente por células T, o uso de rituximab, um anticorpo anti-CD20, mostrou-se promissor, sendo que os pacientes tratados com esse anticorpo monoclonal apresentaram níveis maiores de peptídeo-C quando comparados aos não tratados. Contudo, vale ressaltar que a segurança dessa droga ainda é questionada, já que pacientes tratados com rituximab possuem uma menor capacidade de desenvolverem respostas imunológicas aos agentes infecciosos (Pescovitz *et al.*, 2009; Lernmark e Larsson, 2013). O abatacept (anti-

CTLA-4) mostrou-se capaz de preservar a função das células β nos pacientes com DM-1, porém por apenas 6 meses (Orban *et al.*, 2011).

O uso de ATG (*anti-thymocyte globulin*) apresentou alguns benefícios em camundongos NOD, sobretudo por induzir a imunossupressão (e não depleção) de células T (Gurkan *et al.*, 2010; Lernmark e Larsson, 2013). Porém, em humanos, o tratamento de pacientes com DM-1 com ATG apresentou sérios efeitos adversos (Lernmark e Larsson, 2013).

Outra abordagem terapêutica é o uso de DiaPep277, um peptídeo sintético de 24 aminoácidos derivado da proteína de choque térmico hsp60 com propriedades imunossupressoras. O tratamento de pacientes com DM-1 com o DiaPep277 mostrou-se bastante seguro e capaz de retardar a destruição das células β pancreáticas sem, contudo, induzir melhora nos níveis de glicose no sangue e nem independência insulínica nesses pacientes (Huurman *et al.*, 2007).

Recentemente, Bart e colaboradores demonstraram que o uso de várias doses da vacina de DNA plasmidial (BHT-3021), que codifica a pró-insulina, em pacientes com DM-1 foi capaz modular a resposta imunológica nesses pacientes, evidenciada pela redução na frequência de células T $CD8^+$ específicas para a insulina. Os autores também observaram que houve melhora nos níveis de peptídeo-C produzido pelos pacientes durante o período em que foram vacinados (3 meses), porém essa melhora manteve-se somente por mais 3 meses após a última vacinação (Roep *et al.*, 2013).

Em 2003, nosso grupo liderado pelo Prof. Dr. Júlio César Voltarelli (*in memoriam*), iniciou um estudo clínico pioneiro de fase I/II no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Vinte e cinco pacientes com DM-1 recém-diagnosticado foram submetidos à terapia de imunossupressão em altas doses (IAD) seguida pelo transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH), dos quais 84% dos pacientes diabéticos transplantados alcançaram independência insulínica completa por um período de tempo prolongado, porém variável. Os pacientes que ficaram continuamente livres de insulina, durante o período analisado, apresentaram níveis séricos mais elevados de peptídeo-C (Voltarelli *et al.*, 2007; Couri *et al.*, 2009; Couri e Voltarelli, 2009). Atualmente, dos 25 pacientes transplantados, 3 continuam livres de insulina, 18 pacientes "recaíram" (voltaram a usar insulina após período variável livre de insulina; atualmente usam quantidades diárias de insulina menores) e 4 não responderam ao tratamento (Voltarelli *et al.*, 2007; Couri *et al.*, 2009; Couri e Voltarelli, 2009). Recentemente, um grupo polonês utilizou protocolo clínico similar ao do nosso grupo e reproduziu nossos

resultados, demonstrando que 7 de 8 pacientes submetidos a IAD/TACTH tornaram-se independentes da administração exógena de insulina (Snarski *et al.*, 2011).

Ainda utilizando protocolos similares, um grupo de 13 pacientes chineses recém-diagnosticados para o DM-1 foi submetido ao TACTH (Li *et al.*, 2012). Desses 13 pacientes, 3 ficaram livres de insulina por um período de tempo variável (de 7 a 54 meses), enquanto 2 não responderam ao tratamento. Contudo, os pacientes que continuaram a usar insulina exógena ou que ficaram livres por um tempo e voltaram a usar, tiveram uma redução nas necessidades diárias de insulina. Além disso, nos 11 pacientes que responderam ao tratamento foi visto o aumento dos níveis de peptídeo-C (Li *et al.*, 2012).

1.3 Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas para doenças autoimunes

Apesar dos tratamentos convencionais com drogas imunossupressoras, quimioterápicos ou novas terapias (anticorpos monoclonais, peptídeos sintéticos e vacinas de DNA) promoverem o controle das DAIs em vários pacientes afetados, eles são incapazes de curá-las, havendo assim, a necessidade de novas estratégias terapêuticas para essas doenças (Farge *et al.*, 2010). O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) precedido por uma imunossupressão em altas doses surgiu em 1996 como uma alternativa terapêutica para DAIs refratárias aos tratamentos convencionais (Tyndall e Gratwohl, 1996; Tyndall *et al.*, 1997; Burt, Traynor, *et al.*, 1998; Wulffraat *et al.*, 1999; Hough, Snowden e Wulffraat, 2005; Bohgaki, Atsumi e Koike, 2008; Couri e Voltarelli, 2009).

O TCTH envolve a administração de células-tronco hematopoéticas (CTHs), as quais possuem a capacidade de auto-renovação e de originar todos os tipos celulares maduros do sistema hematopoético e imunológico. O fenótipo dessas células é caracterizado pela ausência de marcadores de linhagem na superfície celular e pela expressão de CD34 em humanos (Sykes e Nikolic, 2005; Couri, De Oliveira e Simões, 2012).

O paciente é preparado para o transplante por um tratamento prévio com um imunossupressor em altas doses seguido pela infusão de CTHs autólogas ou alogênicas (coletadas de um doador compatível) para a reconstituição dos sistemas hematopoético

e imunológico do receptor, evitando citopenias prolongadas (Sykes e Nikolic, 2005; Burt *et al.*, 2008; Voltarelli e Couri, 2009).

Dados experimentais obtidos em modelos animais de DAIs constituem a base racional dessa terapia e suportam a aplicação clínica da mesma (Van Bekkum, 2002; Van Bekkum, 2003). Nos modelos experimentais foi observado que o período no qual o TCTH autólogo é realizado é muito importante, apresentando maior sucesso quando realizado nos estágios iniciais das doenças (Burt, Padilla, *et al.*, 1998). Além disso, o tipo de condicionamento também se apresentou muito importante, sendo que o aumento da intensidade do condicionamento correlacionou-se positivamente com o sucesso do transplante autólogo (Sykes e Nikolic, 2005; Muraro e Douek, 2006).

O TCTH autólogo tem sido preferido ao alogênico devido à alta toxicidade, ao elevado potencial de rejeição observado nos transplantes alogênicos e à escassez de doadores compatíveis (Farge *et al.*, 2010). Além disso, o risco de ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro (*Graft versus Host Disease* - GVHD) no transplante alogênico está associado a significantes índices de mortalidade e morbidade (Sykes e Nikolic, 2005).

Nos últimos anos, vários ensaios clínicos demonstraram que a IAD seguida do TACTH é capaz de suprimir a atividade inflamatória em pacientes com DAIs e pode induzir remissões clínicas prolongadas. Embora os resultados variem de doença para doença, mais de um terço dos pacientes apresentam remissões completas e prolongadas, frequentemente sem necessidade de uso de drogas imunossupressoras (Burt *et al.*, 2003; Popat e Krance, 2004; Tyndall e Saccardi, 2005; Burt *et al.*, 2008; Sullivan, Muraro e Tyndall, 2010).

Farge e colaboradores (2010) avaliaram retrospectivamente um grupo de 900 pacientes com DAIs refratárias aos tratamentos convencionais submetidos ao TACTH em 27 países, entre 1996 e 2007. Segundo os autores, o transplante foi capaz de induzir remissão clínica por mais de cinco anos, com sobrevida global de 85% dos pacientes e sobrevida livre de progressão da doença em 43% dos pacientes, confirmando, portanto, que o TACTH é uma alternativa terapêutica eficaz e segura para pacientes com DAIs (Farge *et al.*, 2010).

A base racional do TACTH é que a imunossupressão intensa possa eliminar os linfócitos T e B autorreativos, entretanto vários estudos vêm mostrando que o transplante também permite a reconstituição de um sistema imunológico "novo" e o

restabelecimento da tolerância imunológica por período de tempo variável (De Kleer *et al.*, 2006; Bohgaki, Atsumi e Koike, 2008; Burt *et al.*, 2008; Hügle e Daikeler, 2010).

Assim, sugere-se que o mecanismo de ação do TACTH seja baseado na reprogramação do sistema imunológico após o transplante ou "*immuno resetting"* (Burt *et al.*, 2003; Muraro e Martin, 2003); (Sykes e Nikolic, 2005; Burt *et al.*, 2008; Hügle e Daikeler, 2010; Sullivan, Muraro e Tyndall, 2010). Dados recentes mostram que o "*immuno resetting"* ocorre pela renovação do repertório de células T e B e também pela restauração das vias de imunorregulação nos pacientes (Sullivan, Muraro e Tyndall, 2010).

Por outro lado, dados indicam que as células B e T de memória (incluindo as autorreativas patogênicas) não são completamente removidas do sistema hematopoético e linfoide e de órgãos alvos, por qualquer que seja o regime de condicionamento (Van Wijk *et al.*, 2008; Couri, De Oliveira e Simões, 2012). Assim, a imunoablação incompleta pode ser responsável pelas recaídas precoces observadas em alguns ensaios clínicos de TACTH (Tyndall e Saccardi, 2005). No entanto, há evidências de melhora e remissão da DAI após o TACTH apesar da imunoablação incompleta (Muraro e Douek, 2006). Além disso, dentre pacientes que recaem, vários passam a responder aos tratamentos convencionais que não eram efetivos antes do transplante (Tyndall e Saccardi, 2005).

Muraro e colaboradores (2005) observaram que após o TACTH, pacientes com esclerose múltipla (EM) reconstituíram um repertório diverso de células T, no qual cerca de 90% das células T reconstituídas apresentaram novas e diferentes especificidades quando comparadas com o pré-transplante (Muraro *et al.*, 2005; Abrahamsson e Muraro, 2008).

Recentemente, Darlington e colaboradores (2013), observaram que pacientes com EM submetidos ao TACTH reconstituíram um repertório de células T com ampla diversidade e a produção tímica foi evidenciada pelos elevados níveis de TRECs no sangue periférico (*T cell receptor excision circles;* que são os círculos de DNA excisados a partir rearranjo do TCR durante o desenvolvimento dos linfócitos), corroborando com dados da literatura. Nesse estudo, também foi demonstrado que após o TACTH não houve redução da resposta de linfócitos do padrão Th1, contudo a resposta de linfócitos do padrão Th17 foi significativamente menor após o transplante (Darlington *et al.*, 2013).

Em um estudo com doze pacientes com artrite juvenil idiopática (JIA) submetidos à IAD/TACTH, foi observado um aumento de células Tregs em até oito semanas após o transplante, enquanto todos os pacientes apresentaram grande depleção de células T $CD4^+$ totais até um ano após o transplante (De Kleer *et al.*, 2006). Além disso, as células T $CD4^+$ apresentaram maior expressão de GATA-3 e IL-10 e menor expressão de IFN-γ, indicando a reconstituição de um padrão Th2 e regulador após o transplante. Esses dados sugerem que o TACTH foi capaz de restabelecer a tolerância imunológica nesses pacientes basicamente pela reconstituição de células Tregs e pela reconstituição de um novo padrão de células T (De Kleer *et al.*, 2006).

Zhang e colaboradores (2009) observaram aumento do número de células T reguladoras $CD4^+$ $CD25^{high}$ $FoxP3^+$ e $CD8^+FoxP3^+$ em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico submetidos ao TACTH (Zhang *et al.*, 2009).

Em suma, esses estudos têm demonstrado que a melhora clínica observada em pacientes com DAIs após o TACTH pode ser devido, sobretudo, à reativação tímica observada após transplante e consequente restauração de um repertório novo e diverso de células T, bem como a produção *de novo* de células Tregs naturais (Farge *et al.*, 2005; Muraro *et al.*, 2005; De Kleer *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2009; Farge *et al.*, 2010; Couri, De Oliveira e Simões, 2012).

Nosso grupo tem estudado os mecanismos imunológicos de ação do TACTH em pacientes com EM e DM-1. Os pacientes com EM foram divididos em dois grupos com base na resposta clínica após o transplante: 22 respondedores (EM-R) e 15 não-respondedores (EM-NR). Os pacientes com DM-1 foram divididos em dois grupos com base no tempo de remissão da doença livre de insulina após o transplante: livre de insulina por período maior ou igual a 3 anos (DM-1≥3anos; n=11) e livre de insulina por período menor que 3 anos (DM-1<3anos; n=10). Nossos resultados mostraram um aumento significativo do número de células T reguladoras $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ somente no grupo de pacientes com DM-1 livres de insulina ≥ 3 anos, e um aumento significativo das mesmas em ambos os grupos de pacientes com EM (manuscrito em preparação).

Os grupos de pacientes com melhor resposta clínica após o tratamento com IAD/TACTH (DM-1≥3anos e EM-R), em comparação aos outros grupos, apresentaram números menores de células T $CD4^+$ de memória efetora. Além disso, esse grupo de pacientes com melhor resposta clínica apresentou, em relação ao período pré-

transplante, números diminuídos de células T $CD3^+$ (linfopenia) em mais períodos pós-transplante e número aumentado de células T $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$. O aumento das subpopulações de células T reguladoras poderia contribuir para o controle da autoimunidade e restabelecimento da tolerância imunológica nesses pacientes, pelo menos temporariamente (manuscrito em preparação).

Nos pacientes com DM-1, nosso grupo também demonstrou um aumento pós-transplante da expressão de genes pró-apoptóticos (como Fas e FasL) nas células mononucleares de sangue periférico de pacientes após o TACTH, que estava diminuída no período pré-transplante (De Oliveira *et al.*, 2012). Esses estudos do nosso grupo revelaram resultados inéditos que contribuem para o esclarecimento dos mecanismos imunológicos de ação da terapia de IAD/TACTH no tratamento do DM-1 e EM, o que é necessário para melhoria do protocolo clínico e aplicação mais ampla dessa terapia como tratamento dessas doenças (manuscrito em preparação).

Li e colaboradores (2012) também avaliaram a reconstituição imunológica em 13 pacientes chineses recém-diagnosticados para o DM-1 submetidos ao TACTH. Nesse estudo, foi demonstrado que o número de células T totais $CD3^+$ foi significativamente diminuído durante o primeiro ano após o transplante em relação ao pré-transplante. O número de células T $CD4^+$ manteve-se menor em relação ao pré-transplante durante todo o período de seguimento pós-TACTH (três anos), enquanto a número de células T citotóxicas $CD3^+CD8^+$ atingiu valores basais normais um ano pós-transplante. Além disso, os autores demonstraram a redução das concentrações de IL-1, IL-17 e TNF-α no soro desses pacientes entre três e seis meses pós-transplante e aumento da concentração de TGF-β três anos após o transplante (Li *et al.*, 2012).

1.4 Reconstituição imunológica após o transplante de células-tronco hematopoéticas

O TCTH está associado a uma profunda imunodeficiência nos primeiros meses pós-transplante, o que aumenta a propensão ao desenvolvimento de inúmeras infecções (Wingard, Hsu e Hiemenz, 2010). Após o TACTH, a reconstituição da imunidade inata ocorre primeiro que a reconstituição da imunidade adaptativa (Auletta e Lazarus, 2005; Geddes e Storek, 2007; Darlington *et al.*, 2013).

A reconstituição de células T após o TCTH pode resultar de dois mecanismos distintos: 1, reconstituição timo-dependente (geração de novas células T a partir de

progenitores linfoides no timo); 2, reconstituição timo-independente (expansão periférica de linfócitos T maduros que foram reinfundidos junto com as CTHs ou que não foram completamente eliminados *in vivo* pela imunossupressão em altas doses) (Williams, Hakim e Gress, 2007).

A expansão periférica de células T, também chamada de LIP (*lymphopenia induced proliferation*), ocorre nos primeiros meses após o transplante, quando a produção tímica ainda não é suficiente para reconstituir o *pool* de células T. A LIP é o resultado de uma rápida e significante expansão de células T, mediada por citocinas como IL-7 e IL-15, em que pode ser observada a mudança do fenótipo e da função de células T *naive*, que então passam a assumir características e funções de células T de memória (Fry e Mackall, 2005; Williams, Hakim e Gress, 2007; Surh e Sprent, 2008; Van Wijk *et al.*, 2008; Jameson e Masopust, 2009; Takada e Jameson, 2009). Durante a LIP, também se observa a redução na frequência de TRECs, assim como um repertório de células T bastante restrito, com expansões oligoclonais e diversidade limitada (Douek *et al.*, 2000; Hazenberg *et al.*, 2001; Storek *et al.*, 2008; Sullivan, Muraro e Tyndall, 2010). Portanto, nos primeiros meses após o TACTH a reconstituição de células T é predominantemente timo-independente, caracterizada por uma expansão de células T $CD8^+$ de memória.

Estudos indicam que as células T $CD4^+$ são mais dependentes da produção tímica para sua reconstituição (Storek *et al.*, 2001; Hakim *et al.*, 2005; Geddes e Storek, 2007; Williams, Hakim e Gress, 2007; Alexander *et al.*, 2009). Portanto, a reconstituição de células T $CD4^+$ após o transplante é particularmente mais lenta em pacientes mais velhos que apresentam menor função tímica. A contagem de células T $CD4^+$ pode manter-se baixa por vários anos, apresentando principalmente o fenótipo de memória ou efetor (Hentschke *et al.*, 2005; Geddes e Storek, 2007; Williams, Hakim e Gress, 2007; Darlington *et al.*, 2013). Já, o número de células T $CD8^+$ se recupera relativamente rápido após o transplante, atingindo valores normais um ano após o transplante. Essas células possuem o fenótipo $CD8^+CD28^-CD57^+$ e sua rápida expansão é decorrente da proliferação homeostática que ocorre nos primeiros meses pós-transplante (Geddes e Storek, 2007; Jameson e Masopust, 2009; Darlington *et al.*, 2013).

Estudos indicam que células T reguladoras (Tregs) possuem alta capacidade de sobreviver a vários tipos de regimes de imunossupressão. Além disso, apresentam rápida expansão, que antecede a reconstituição de números significantes de células T

naive. Seis meses após o transplante, essas células atingem valores normais e continuam expandindo até aproximadamente 12 meses pós-transplante (Bayer, Yu e Malek, 2007; Sullivan, Muraro e Tyndall, 2010). Estudos vêm mostrando a grande importância das Tregs na regulação da expansão homeostática periférica (LIP) de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, característica dos primeiros meses após o TACTH, impedindo uma resposta exacerbada dessas células efetoras (Annacker *et al.*, 2001; Hagen *et al.*, 2004; Van Wijk *et al.*, 2008; Winstead, Fraser e Khoruts, 2008).

1.4.1 Reconstituição timo-dependente e *T cell receptor excision circles*

A reativação tímica, que ocorre em fases mais tardias após o transplante, apresenta profundas consequências na reconstituição imunológica após o TACTH. Por meio de técnicas de sequenciamento, foi observado que a população de células T *naive* é a responsável pela geração e a manutenção homeostática de um repertório de células T diverso. A avaliação do repertório de células T após o TCTH reflete essa produção tímica de novas de células T *naive* (Dumont-Girard *et al.*, 1998; Hakim *et al.*, 2005; Toubert *et al.*, 2012). Foi demonstrado que em indivíduos adultos saudáveis, as células T de memória correspondem a menos de 1% da diversidade das células T αβ (Arstila *et al.*, 1999; Toubert *et al.*, 2012).

O modo como a reativação tímica e a LIP afetam a reconstituição das células T é dependente de vários fatores, tais como a idade do paciente, o número de células T residuais que sobreviveram à imunossupressão, os níveis de citocinas como IL-7 e IL-15 e os danos causados ao tecido tímico devido ao uso de drogas imunossupressoras (Hentschke *et al.*, 2005; Williams, Hakim e Gress, 2007; Toubert *et al.*, 2012).

Dados da literatura demonstram que, apesar da atividade e o tamanho do timo diminuírem com a idade, a sua atividade não é completamente eliminada (Lynch *et al.*, 2009). Portanto, a reativação tímica e aumento de sua produção após o transplante pode corrigir alguma deficiência pré-existente e normalizar a homeostase das células T *naive*, gerando um repertório de células T mais diverso e funcional (Douek *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2009).

A avaliação da reconstituição imunológica timo-dependente após o transplante pode ser feita por meio da quantificação de TRECs (*T cell receptor excision circles*) (Douek *et al.*, 1998; Douek *et al.*, 2000). Os TRECs são moléculas circulares de DNA,

formadas e excisadas durante a recombinação V(D)J do receptor das células T (Douek *et al.*, 2000; Talvensaari *et al.*, 2002; Muraro *et al.*, 2005).

Um evento comum durante a recombinação da cadeia α do TCR é a deleção do *locus* da cadeia do TRC δ, o qual está inserido no *locus* da cadeia α. Essa deleção ocorre através do rearranjo específico entre δRec e ψJα, levando a geração de um TREC específico chamado de *"signal joint"* (sjTREC), presente em aproximadamente 70% das células T αβ (Geenen *et al.*, 2003; Madhok *et al.*, 2005; Williams, Hakim e Gress, 2007).

Os sjTRECs são moléculas de DNA estáveis localizadas no citoplasma das células T que não são duplicadas durante a divisão celular (Douek *et al.*, 2000; Muraro *et al.*, 2005; Just *et al.*, 2008). Eles são encontrados em alta concentração em células T $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ *naive*, também chamadas de recém-emigrantes do timo, porém não são encontrados em células T de memória, células B e em células T γδ (Douek *et al.*, 1998; Kimmig *et al.*, 2002).

Estudos que quantificaram TRECs no sangue periférico de pacientes com esclerose múltipla após a IAD/TACTH demonstraram que a reconstituição imunológica timo-dependente é reativada após o transplante (Sun *et al.*, 2004; Muraro *et al.*, 2005). Sun *et al.* (2004) mostraram que nesses pacientes, o número de moléculas de TRECs estava diminuído drasticamente até seis meses após o transplante, aumentando para valores próximos aos normais (período pré-transplante) após doze meses do transplante.

Alexander *et al.* (2009) demonstraram que a reativação tímica é de extrema importância para o restabelecimento dos valores normais de células T em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico após o TACTH. Seis meses após o transplante os autores demonstraram um aumento significativo da frequência de células T $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ recém-emigrantes do timo nos pacientes submetidos ao TACTH, quando comparado ao período pré-transplante e aos indivíduos do grupo controle.

1.5 Receptor de células T e reconstituição do repertório de células T após o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

O receptor de células T (TCR) é um heterodímero de membrana formado pelas cadeias α e β ou pelas cadeias γ e δ, e cada cadeia do TCR é codificada por múltiplos segmentos gênicos que sofrem recombinação somática. O TCR αβ é o receptor mais

comum das células T, sendo formado por duas cadeias polipeptídicas com domínios variáveis (Vα e Vβ) e domínios constantes (Cα e Cβ) (Pannetier *et al.*, 1993).

Análises da estrutura tridimensional do TCR αβ mostraram que os domínios variáveis Vα e Vβ formam três alças que interagem com o complexo peptídeo-MHC, as quais correspondem às Regiões Determinantes de Complementaridade (*Complementarity Determining Region* - CDR) (Garcia *et al.*, 1996; Boyman *et al.*, 2009). Os genes Vα e Vβ codificam as regiões CDR1 e CDR2, e a região CDR3 é gerada pela recombinação somática dos segmentos V e J para a cadeia Vα, e dos segmentos V, D e J para a cadeia Vβ, sendo esta a região de maior variabilidade e responsável pelo contato com o antígeno apresentado pelas moléculas de MHC (*major histocompatibility complex*) (Davis e Bjorkman, 1988; Garcia, Teyton e Wilson, 1999).

A região CDR3 consiste numa sequencia única de nucleotídeos que é específica para um tipo particular de célula T, variando de tamanho conforme ocorre a adição ou a remoção de nucleotídeos nas junções V-J (cadeia α) e V-D-J (cadeia β) no final do processo de recombinação (diversidade juncional) (Yassai *et al.*, 2009). Na cadeia variável β do TCR, a região CDR3 está localizada entre os resíduos de aminoácidos 95-106.

Por meio da técnica chamada *Immunoscope* ou *TCRBV CDR3 Length Spectratyping* é possível avaliar os diferentes fragmentos de CDR3 gerados durante o processo de recombinação V(D)J (Pannetier *et al.*, 1993; Pannetier, Even e Kourilsky, 1995). Essa técnica consiste em uma reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) baseada na análise da variação do tamanho da região CDR3 da cadeia β do TCR, seguida da análise dos fragmentos de DNA por sequenciamento. Na PCR são utilizados *primers* Vβ e Cβ específicos para as regiões variável e constante, respectivamente, do TCR. Considerando que a posição dos *primers* Vβ e Cβ utilizados é fixa, o tamanho observado para o produto de PCR Vβ-Cβ marcado depende do tamanho da junção V-D-J de cada TCR específico (Pannetier *et al.*, 1993; Pannetier, Even e Kourilsky, 1995).

Portanto, o método de *TCRBV CDR3 Spectratyping* permite analisar a diversidade do repertório de linfócitos T e detectar populações celulares em expansão clonal a partir da variação do comprimento da região CDR3 da cadeia β do TCR. Considerando-se que o padrão de distribuição dos segmentos do CDR3 da cadeia Vβ em indivíduos sadios apresenta predominantemente uma distribuição gaussiana, esta técnica permite detectar variações no padrão de distribuição desses segmentos em condições

patológicas. Deste modo, qualquer expansão clonal anormal de uma determinada família (ou cadeia) Vβ no repertório de linfócitos T pode ser avaliada pela detecção de segmentos que desviam da distribuição gaussiana normal dos segmentos de CDR3 (Pannetier *et al.*, 1993; Pannetier, Even e Kourilsky, 1995; Memon *et al.*, 2012).

Assim, ao contrário de outras técnicas de avaliação da reconstituição do repertório de linfócitos T, como citometria de fluxo (a qual utiliza anticorpos monoclonais específicos para as famílias Vβ ou Vα) ou técnicas de PCR e PCR em tempo real que permitem somente a identificação e quantificação de famílias Vβ ou Vα específicas expandidas em determinada amostra, o método de *TCRBV CDR3 Spectratyping* fornece informação em relação ao padrão de distribuição dos segmentos do CDR3 e à diversidade do repertório (Pannetier *et al.*, 1993; Pannetier, Even e Kourilsky, 1995; Memon *et al.*, 2012; Van Heijst *et al.*, 2013).

Vários estudos mostraram que pacientes com DAIs apresentam restrição do repertório de células T, com expressão anormal de algumas famílias Vβ. Essas anormalidades do repertório de células T *naive* podem contribuir para a predisposição do indivíduo ao desenvolvimento da DAI (Goronzy, Zettl e Weyand, 1998; Luppi *et al.*, 2000; Davidson e Diamond, 2001; Sun *et al.*, 2004; Farge *et al.*, 2005; Sospedra e Martin, 2005).

Luppi e colaboradores (2000) demonstraram que a família Vβ7 do receptor da célula T apresenta alta frequência em pacientes norte-americanos recém-diagnosticados para o DM-1. Além disso, foi visto que muitos indivíduos com predisposição genética para o desenvolvimento do DM-1 tornaram-se diabéticos após infecções por enterovírus. Curiosamente, durante a infecção por esses vírus foi detectada alta frequência de células T expressando a cadeia Vβ7 nesses pacientes, sugerindo a importância de infecções por enterovírus no desencadeamento e progressão do DM-1 (Luppi *et al.*, 2000).

Goronzy e colaboradores (1998) demonstraram que pacientes com artrite reumatoide possuem um repertório de células T restrito, caracterizado por expansões oligoclonais de algumas especificidades de células T. O mesmo foi observado em pacientes com tireoidite de Hashimoto, os quais apresentam grande restrição do repertório de células T, sobretudo das células T $CD8^+$ (Okajima *et al.*, 2009).

Pacientes com esclerose múltipla (EM) também apresentam distribuição alterada dos picos de CDR3 (não-gaussiana), sugerindo expansões oligoclonais. Nesses pacientes observou-se um aumento da secreção de IFN-γ, IL-2 e TNF-α pelas

subpopulações de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) em expansão oligoclonal (Laplaud *et al.*, 2004).

Outro trabalho mostrou que pacientes com EM, cujo repertório de células T era restrito devido à expansões clonais de células T maduras periféricas, apresentaram um aumento da produção de células T *naive* e consequente diversificação do repertório de células T após o tratamento com IAD/TACTH (Packer e Muraro, 2007).

1.6 Justificativa e Hipótese do estudo

A terapia de IAD seguida pelo TACTH para o DM-1 recém-diagnosticado revelou-se promissora, pois a maioria dos pacientes diabéticos transplantados alcançou independência insulínica completa por um período prolongado (Voltarelli *et al.*, 2007; Couri e Voltarelli, 2009). No entanto, até o momento, os mecanismos de ação celulares e moleculares desta terapia envolvidos na remissão ou não do DM-1 e de várias outras DAIs ainda não foram completamente esclarecidos (Darlington *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, alguns estudos mostraram que pacientes com DAIs possuem o repertório de células T restrito (com expansões oligoclonais e/ou monoclonais) e que após o TACTH há uma reativação da produção tímica de células T *naive* e consequente restauração de um repertório de células T novo e diverso, sugerindo a reprogramação do sistema imunológico após a terapia com IAD/TACTH (Goronzy, Zettl e Weyand, 1998; Muraro *et al.*, 2002; Muraro e Martin, 2003; Sun *et al.*, 2004; Muraro *et al.*, 2005; Muraro e Douek, 2006; Abrahamsson e Muraro, 2008; Burt *et al.*, 2009; Okajima *et al.*, 2009).

Com base nesses trabalhos, nossa hipótese é que após a IAD/TACTH haja um aumento nos níveis de TRECs nos pacientes com DM-1 em relação ao período pré-transplante, indicando uma reativação da produção tímica de novas células T, o que explicaria a melhora clínica inicial na maioria dos pacientes. Nos períodos mais tardios após o transplante, nossa hipótese é que a restrição da diversidade do repertório de células T (com possíveis expansões clonais de células autorreativas) correlaciona-se com a recaída do DM-1 e consequente necessidade do uso de insulina novamente.

Além disso, supomos que os pacientes com DM-1 que permanecem livres de insulina por mais tempo apresentam maiores níveis de TRECs e um repertório de células T mais diverso após o transplante, em relação aos pacientes que voltam a usar

insulina (após um período variável livres da mesma) ou nos pacientes que não responderam ao tratamento.

Para confirmar essas hipóteses, este estudo se propôs a avaliar a função tímica nos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após a terapia de IAD/TACTH, e correlacionar esses dados com a resposta terapêutica dos pacientes. Os resultados desse trabalho são inéditos e contribuem para o esclarecimento dos mecanismos imunológicos de ação e os benefícios da terapia de IAD/TACTH no tratamento do DM-1, o que é necessário para a aplicação mais ampla e efetiva desta terapia nesses pacientes.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a função tímica de células T em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) antes e após a terapia de imunossupressão em altas doses seguida pelo transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (IAD/TATCH).

2.2 Objetivos específicos

1. Quantificar os níveis de *T-cell receptor excision circles* (TRECs) em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com DM-1 antes e após a terapia de IAD/TACTH pela técnica de PCR em tempo real;
2. Analisar a diversidade e composição do repertório de células T do sangue periférico dos pacientes com DM-1 antes e após a terapia de IAD/TACTH pela técnica molecular de *TCRBV CDR3 Spectratyping;*
3. Comparar os níveis de TRECs em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com DM-1 antes da terapia de IAD/TACTH com os de indivíduos sadios;
4. Comparar a diversidade e composição do repertório de células T dos pacientes com DM-1 antes da terapia de IAD/TACTH com as de indivíduos sadios;
5. Comparar os níveis de TRECs em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com DM-1 antes e após a terapia de IAD/TACTH;
6. Comparar a diversidade e composição do repertório de células T dos pacientes com DM-1 antes e após a terapia de IAD/TACTH;
7. Correlacionar os níveis de TRECs e a diversidade do repertório de células T dos pacientes com DM-1 antes após a terapia de IAD/TACTH com a resposta clínica dos pacientes;
8. Correlacionar os níveis de TRECs com a diversidade do repertório de células T dos pacientes com DM-1 antes e após a terapia de IAD/TACTH;
9. Correlacionar os níveis de TRECs e a diversidade do repertório de células T dos pacientes com DM-1 antes após a terapia de IAD/TACTH com os níveis séricos de peptídeo-C nos pacientes.

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3 Delineamento experimental

Foram estudados pacientes com DM-1, os quais foram submetidos ao tratamento com IAD/TACTH na Unidade de TMO do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, de dezembro de 2003 a dezembro de 2010. Foram analisadas amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes com DM-1 antes do transplante (pré-mobilização) e em vários períodos após o transplante (D+100, D+180, D+360, D+540, D+720, D+900, D+1080, D+1260, D+1440, D+1620, D+1800 e nos períodos de recaída).

Para correlacionar com os dados da quantificação dos níveis de TRECs e da análise do repertório de células T do pacientes com DM-1, amostras de sangue periférico de indivíduos sadios (grupo controle de doadores voluntários de repetição do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto) foram coletadas sob consentimento informado.

Do sangue periférico das amostras de pacientes e controles foram isoladas as células mononucleares (PBMCs), a partir das quais foi feita a extração de DNA e de RNA. O DNA foi congelado em solução de congelamento (soro bovino fetal + 10% de DMSO) e posteriormente usado para a quantificação de TRECs, enquanto o RNA foi transcrito em cDNA, o qual foi utilizado para a análise da diversidade do repertório de células T através do método *TCRBV CDR3 Spectratyping*.

A técnica de quantificação dos TRECs foi padronizada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP, utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA).

A técnica *TCRBV CDR3 Spectratyping* foi padronizada no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração do HCFM-USP (grupo da Profa. Dra. Luiza Guilherme Guglielmi) e foi implantada no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Esta técnica inicia-se partir da amplificação por PCR dos segmentos Vβ-Cβ do TCR na qual se utilizou *primers* específicos para cada uma das famílias Vβ (foram analisadas 24 famílias Vβ). O produto da primeira reação foi submetido a uma segunda amplificação por PCR (que inclui um *primer* adicional marcado com fluorocromo), na qual se amplifica o segmento gênico que contém a região CDR3 do TCR. Em seguida,

estes segmentos amplificados por PCR foram analisados em sequenciador (análise de fragmentos) e, com o auxílio do software *Gene Mapper* ™ (Applied Biosystem), foi calculado o tamanho (em pares de bases) dos diferentes segmentos (picos) de CDR3, o número de picos de CDR3, estimada a frequência de cada família Vβ no repertório do TCR e analisada a distribuição (gaussiana ou não gaussiana) dos picos na região CDR3.

4 Casuística, Material e Métodos

4.1 Pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e controles

Foram estudadas amostras de sangue periférico coletadas de pacientes com DM-1 submetidos ao tratamento com imunossupressão em altas doses (IAD) seguida do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH), na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), de dezembro de 2003 a dezembro de 2010. O protocolo clínico de IAD/TACTH para o DM-1 foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (Proc. 10095/02) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (RG 7160). Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas antes do transplante (pré-mobilização) e em vários períodos após o transplante (D+100, D+180, D+360, D+540, D+720, D+900, D+1080, D+1260, D+1440, D+1620, D+1800 e recaída).

Foram incluídos nesse estudo, 23 pacientes com DM-1 recém-diagnosticado, sendo seis do sexo feminino e dezessete do sexo masculino, com idade variando de 13 a 31 anos (média = 18,1) As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes estão sumarizadas nas **Tabelas 5 e 6**.

O TACTH foi realizado dentro de no máximo seis semanas após o diagnóstico de DM-1 nesses pacientes. Todos pacientes apresentavam anticorpo anti-GAD65 positivo ao diagnóstico. Foram excluídos do protocolo os pacientes que haviam apresentado episódios de cetoacidose diabética previamente ao diagnóstico.

O esquema do tratamento de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH constituiu em quatro fases: fase de mobilização das células-tronco

hematopoéticas, fase de condicionamento (imunossupressão), fase de infusão de células-tronco hematopoéticas ou transplante propriamente dito e a fase de seguimento dos pacientes nos diferentes períodos pós-transplante (**Figura 1**) (Voltarelli *et al.*, 2007; Couri *et al.*, 2009).

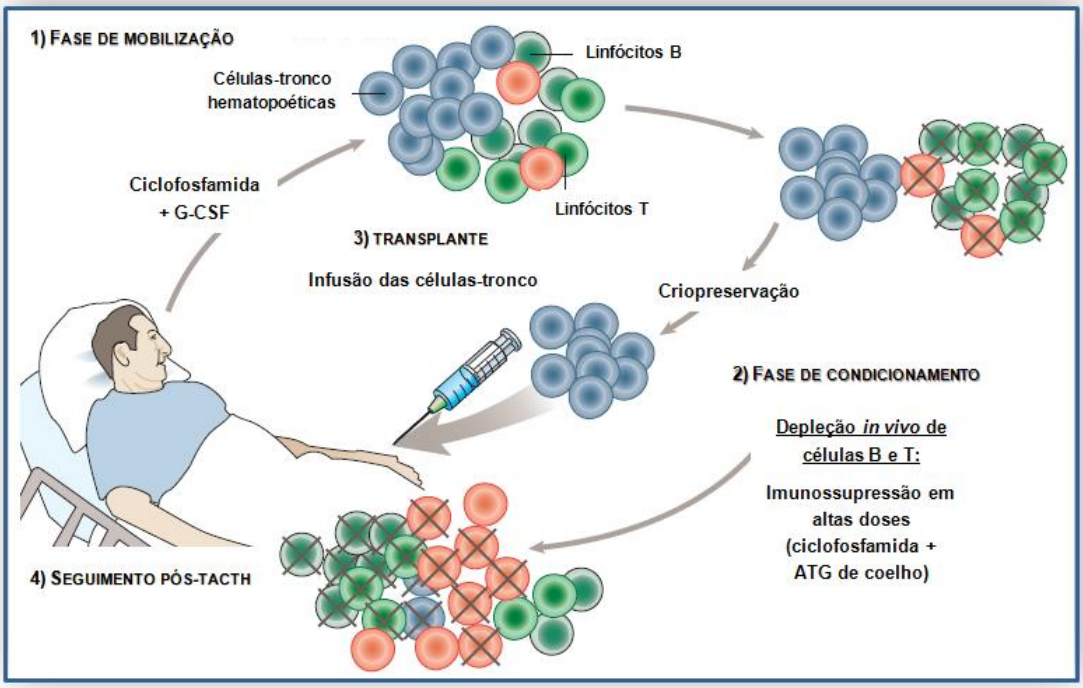


Figura 1. Esquema do procedimento da terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH utilizado nos pacientes com DM-1 na unidade de TMO do HCFMRP-USP (modificado de Sykes e Nikolic, 2005).

Para algumas análises, conforme indicado, os pacientes com DM-1 foram divididos em dois grupos com base na resposta terapêutica (tempo livre de insulina após o transplante): pacientes livres de insulina por período maior ou igual a três anos (DM-1≥3anos; n=11; pacientes DM8, DM9, DM10, DM11, DM12, DM13, DM14, DM15, DM6, DM17 e DM18) e livres de insulina por período menor que três anos (DM-1<3anos; n=9; DM1, DM2, DM3, DM4, DM5, DM6, DM19, DM21 e DM22) **(Tabela 5 e 6)**.

As amostras de sangue periférico de todos os indivíduos sadios (doadores voluntários de repetição do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP) foram colhidas sob consentimento informado. Os indivíduos sadios foram pareados com os pacientes de acordo com o sexo e a idade.

Para a quantificação absoluta dos níveis de TRECs no sangue periférico dos pacientes com DM-1, amostras de dezoito pacientes foram analisadas (sendo 4 do sexo

feminino e 14 do sexo masculino; idade entre 13 e 31 anos, com média de 18,44 anos). Para comparações foi utilizado um grupo controle de vinte e dois indivíduos sadios (sendo 16 do sexo masculino; idade entre 15 e 31 anos, com média de 21,1 anos).

Para a análise do repertório de células T, vinte e três pacientes foram incluídos no estudo (sendo 17 do sexo masculino e 6 do sexo feminino; idade entre 13 e 31 anos, com média de 18,1 anos). Para comparações foi utilizado um grupo controle de sete indivíduos sadios (sendo 3 do sexo masculino; idade entre 17 e 22 anos, com média de 18,8 anos).

Além disso, foi realizada a quantificação do peptídeo-C no soro dos pacientes com DM-1 (n=23) antes do transplante e nos períodos D+180, D+360, D+720, D+1080, D+1440 e D+1800 pós-transplante (**Tabela 5**). A dosagem do peptídeo-C foi realizada pelo Laboratório de Diabetes e Metabolismo do HC-FMRP-USP utilizando *Human C-Peptide radioimmunoassay kit* (Millipore,USA).

4.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

Amostras de sangue periférico colhidas na presença de heparina sódica (14 UI/ml) foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade. As amostras foram diluídas 1:2 em tampão fosfato salina (PBS), aplicadas cuidadosamente sobre o gradiente de Ficoll Hypaque (d=1,077, Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suécia) e centrifugadas a 500g por 30 minutos à temperatura ambiente (TA) para obtenção da camada de células mononucleares. As células presentes na interfase plasma-Ficoll Hypaque foram cuidadosamente coletadas e lavadas duas vezes com PBS. As células mononucleares separadas foram congeladas em solução de congelamento (1x107 células por 1,0 ml de solução de congelamento), constituída de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, USA) + 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e armazenadas em N2 líquido para posterior extração de DNA, como também foram congeladas em solução de Trizol (Invintrogen^{TM}) (1,0 ml de Trizol para cada 1x107 células) em microtubos tratados com DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e armazenadas em freezer -80 C para posterior extração de RNA.

4.3 Extração de DNA das células mononucleares

A extração do DNA foi realizada pelo *DNeasy Blood & Tissue mini kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA). As células mononucleares dos pacientes com DM-1 e dos controles foram descongeladas, adicionadas a 20 ml do meio de cultura RPMI e centrifugadas por 10 minutos a 200g à TA. O pellet de células mononucleares formado foi lavado com PBS 1X, ressuspendido em 200 µl PBS 1X e 20 µl de proteinase K foram adicionados para degradação de proteínas. Posteriormente 200µL de Buffer AL foram adicionados e o conteúdo formado foi misturado no vórtex e incubado a 56°C. Após 10 minutos de incubação, 200 µl de ethanol (100%) foram adicionados e o conteúdo foi misturado novamente no vórtex. A suspensão celular foi pipetada em uma coluna (*DNeasy Mini spin column*) colocada em um tubo de coleta de 2 ml e centrifugado a 6000g por 1 minuto à TA. O tubo coletor e o conteúdo centrifugado foram descartados e a coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2 ml. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 à coluna e o conteúdo foi centrifugado por 1 minuto a 6000g à TA. Novamente o centrifugado e o tubo coletor foram descartados. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2ml, 500 µl de Buffer AW2 foram adicionados e o conteúdo foi centrifugado por 3 minutos a 20,000g à TA para secar a membrana. A coluna foi transferida para um microtubo limpo (RNA-free) e 50 µl de Buffer AE foram pipetados diretamente na membrana para eluir o DNA. O material foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado por mais 1 minuto a 6000g à TA. Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, USA) e então foram diluídas para a concentração de 100 ng de DNA por microlitro.

4.4 Extração de RNA

A extração do RNA das células mononucleares do sangue periférico foi realizada por meio do kit comercial *Pure Link Mini Kit* (Invintrogen™). Inicialmente, o lisado celular com o Trizol foi incubado por 5 minutos a TA. Depois de completamente descongelado, foram adicionados 200µl de clorofórmio para cada 1ml de Trizol e solução de lisado celular/Trizol e clorofórmio foi misturada vagarosamente por 15 segundos. Essa solução foi incubada por 3 minutos a TA e logo após foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Após esta centrifugação, ocorreu a separação da solução

em três fases: fase aquosa, que contém o RNA; a interface, contendo a maior parte do DNA e a fase orgânica, na qual estão as proteínas. A fase aquosa transparente contendo o RNA (aproximadamente 400 µl) foi transferida para um novo microtubo tratado RNase-free. Um volume igual ao da fase aquosa (aproximadamente 400 µl) foi adicionado de etanol 70% e o material foi misturado no vórtex. O material foi transferido (no máximo 700 µl por vez) para uma coluna com tubo coletor (*Spin Cartidge*) e centrifugado 12.000g por 15 segundos a TA. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna inserida no mesmo tubo coletor. Foram adicionados 700µl do *Wash Buffer I* e o material foi centrifugado a 12.000g por 15 segundos a TA. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna inserida em um novo tubo coletor, 500µl *Wash Buffer II* foram adicionados e o material foi centrifugado a 12.000g por 15 segundos a TA. Novamente o conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna inserida no mesmo tubo coletor, 500µl *Wash Buffer II* foram adicionados e o material foi centrifugado a 12.000g por 15 segundos a TA. Posteriormente, o conteúdo do tubo coletor foi descartado, a coluna foi inserida no mesmo novo tubo coletor e o material foi centrifugado a 12.000g por mais 1 minuto a TA para secar a membrana da coluna. A coluna foi inserida dentro de um novo microtubo RNase-free e 30µl de água RNase-free foram adicionados e material foi incubado por 1 minuto a TA. Por fim, o material foi centrifugado a 12.000g por 2 minutos a TA e o RNA foi obtido e armazenado -80°C para posterior síntese de cDNA.

4.5 Eletroforese de RNA em gel de agarose 1%

O RNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de GelRed™ (Biotium), para determinação de sua qualidade e integridade. A eletroforese em gel de agarose foi realizada com corrente elétrica de 80 volts durante 50 minutos e então as bandas 28S, 18S e 5S do RNA ribossômico foram visualizadas em um transiluminador UV. Após a constatação da integridade e qualidade do RNA, este foi utilizado na síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa.

4.6 Transcrição reversa

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram

adicionados ao tubo de reação 62,3 µL de água DEPC, 10 µL de Buffer RT 10X, 10 µL de *Random primers* 10X, 10,4 µL de dNTP 25X, 100 mM, 5,0 µL de Multscribe RT (50U/µL), 0,3 µL de inibidor de RNases e 2,0 µg (2 µL) de RNA, perfazendo um volume total de 100 µL. Este material será incubado a 25ºC por 10 minutos e posteriormente a 37ºC durante duas horas em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). O cDNA sintetizado foi estocado a -20ºC e em seguida utilizado nos ensaios de *TCRBV CDR3 Spectratyping*.

4.7 Validação da transcrição reversa

O gene da β-actina foi utilizado como controle da reação de transcrição do RNA em cDNA. Para esta reação foram utilizados 2 µl do cDNA transcrito, 2,5 µl de tampão para PCR 10X, 1,0 µl de 1,5 mM MgCl2, 3 µl de 10 mM dNTP mix, 1 µl de cada *primer* (10 µM), 0,3 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl) e água DEPC q.s.p. 25µl. Os reagentes foram misturados e centrifugados brevemente, colocados em termociclador pré-aquecido a 94°C, e submetidos a um passo de desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de PCR (desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, completados por uma extensão final de 10 minutos a 72°C). Em seguida, o produto da reação foi mantido a 4°C e carregado em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium), e submetido à corrida eletroforética a 100 V durante 30 minutos. O tamanho esperado do produto de PCR é de 353 pb.

4.8 PCR em tempo real para a quantificação absoluta de TRECs

A quantificação absoluta do gene TREC e do gene da Albumina (controle endógeno) nas células mononucleares de sangue periférico foi analisada por PCR em tempo real. Foram utilizados os reagentes TaqMan™ (Applied Biosystems, USA) e o equipamento 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA). Os plasmídeos contendo os genes TREC e Albumina nos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ngai Ka-Leung (Northwestern University, EUA).

As concentrações dos *primers* e das sondas foram previamente padronizadas, sendo a concentração de 5 µM estabelecida tanto para o *primer forward* como para o

reverse (de ambos genes), e a concentração de 2,5 µM para as sondas do TREC e da Albumina. As sequências dos *primers* e das sondas são específicos para cada gene e estão mostradas nas **Tabelas 1** e **2**.

A cada reação de PCR em tempo real foram preparadas as curvas padrões do gene alvo (TREC) e do gene endógeno (Albumina) utilizando diluições seriadas 1:10 obtidas a partir da concentração inicial de 2×10^9 moléculas de DNA. As amostras das curvas padrões foram preparadas em triplicatas e as concentrações utilizadas foram de $2x10^6$, $2x10^5$, $2x10^4$, $2x10^3$, $2x10^2$ moléculas de DNA.

As reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços e as amostras foram preparadas em duplicatas utilizando-se 8,85 µl de água DEPC, 12,5 µl de TaqMan® Universal PCR Master mix, 0,65 µl da sonda, 1 µl do *primer* forward, 1 µl do *primer* reverse e 1 µl do DNA alvo (100 ng), totalizando 25 µl em cada poço. As reações de PCR em tempo real foram realizadas a 50ºC por 2 minutos, 95º C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95ºC e 60º por 1 minuto.

A determinação da intensidade de fluorescência na reação é dada através do cálculo do ΔRn (ΔRn = Rn+ - Rn-), onde Rn+ = intensidade de emissão do FAM > intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e Rn- = intensidade de emissão do FAM < intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a fluorescência é emitida pelo FAM conforme o componente repórter das sondas (específicas para o TREC e Albumina) é liberado durante cada ciclo de amplificação.

Durante os ciclos iniciais da reação, não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > FAM). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base (*threshold*). O *threshold* deve ser posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação, em um ponto acima do ruído basal e abaixo da fase linear (platô final) da amplificação. O ciclo em que a amostra excede a fluorescência basal é chamado de Ct ou *threshold cycle* e estabelece a quantidade de DNA alvo presente na amostra. Para o gene TREC o *threshold* estabelecido foi de 0,040116, enquanto que para o gene da Albumina foi de 0,020116.

Após cada reação de PCR em tempo real, a quantidade de cópias do gene TREC obtida da amostra foi dividida pela quantidade de cópias do gene endógeno

(normalização da reação), sendo esse resultado expresso em moléculas de TREC/100ng de DNA, já que 100 ng foi a quantidade de DNA utilizada em todas as amostras dos pacientes e controles sadios. O controle endógeno é um gene constitutivamente expresso em todos os tipos celulares, sendo assim utilizado para normalizar as diferenças na amplificação causadas por possíveis diferenças na quantificação do DNA.

Tabela 1. Sequências dos *primers* e da sonda do gene TREC.

	TREC
Primers	F: CACATCCCTTTCAACCATGCT R: GCCAGCTGCAGGGTTTAGG
Sonda	FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACT-TAMRA

Tabela 2. Sequências dos *primers* e da sonda do gene Albumina.

	ALBUMINA
Primers	F: TGCATGAGAAAACGCCAGTAA R: ATGGTCGCCTGTTCACCAA
Sonda	FAM-TGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAA

4.9 Método de TCRBV CDR3 *Spectratyping*

Este método permite analisar a diversidade do repertório de linfócitos T e detectar populações celulares em expansões clonais (Pannetier *et al.*, 1993; Pannetier, Even e Kourilsky, 1995). Esta técnica inicia-se pela amplificação por PCR dos segmentos Vβ-Cβ do TCR utilizando *primers* específicos para cada uma das 24 famílias Vβ que foram estudadas. O produto desta reação é submetido à outra amplificação por PCR que inclui um *primer* adicional marcado com fluorocromo. Nesta segunda reação, amplifica-se o segmento gênico que contém a região CDR3 do TCR, uma vez que esta região está localizada entre os segmentos V-D-J. Em seguida, estes segmentos amplificados por PCR são separados em gel de sequenciamento e, com o auxílio de um sequenciador automático e do software *Gene Mapper*™ (Applied Biosystem), foi

possível calcular o tamanho (em pares de bases) dos diferentes segmentos (picos) de CDR3, o número de picos de CDR3, estimar a frequência de cada família Vβ no repertório do TCR e analisar a clonalidade e distribuição (gaussiana ou não gaussiana) dos picos na região CDR3. Um esquema do método de *TCRBV CDR3 Spectratyping* é mostrado na **Figura 2**.

4.9.1 Reação de PCR (Vβ-Cβ) para determinação das famílias Vβ do TCR

Esta reação possibilita a amplificação do segmento gênico Vβ-Cβ do TCR. Para um volume final de reação de 25µl, foram utilizados 4% de cDNA transcrito, 2,5µl de tampão 10X (500mM KCl e 100mM Tris-HCl), 1 µl de MgCl2 (50mM), 2 µL de dNTP(2,5mM), 0,63 µL do *primer* Cβ (20 µM) e 0,63 µL do *primer* Vβ específico (20 µM), 0,1µL Taq polimerase (5U/µL) e água q.s.p 25 µl. Esta reação foi processada em termociclador por 1 minuto e 30 segundos a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C, completados com uma extensão final de 4 minutos a 72°C. A **Tabela 3** mostra as sequências dos *primers* que foram utilizados para a amplificação das 24 famílias Vβ e o tamanho esperado do produto de PCR (Pannetier *et al.*, 1993; Pannetier, Even e Kourilsky, 1995).

Tabela 3. Sequencia dos *primers* utilizados na amplificação das famílias Vβ do TCR.

FAMÍLIA VB E SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS*	VB-CB (PARES DE BASES)	ESPECIFICIDADES AMPLIFICADAS
VB1 5' CCGCACAACAGTTCCCTGACTTGC 3'	322	VB1S1
VB2 5' GGCCACATACGAGCAAGGCGTCGA 3'	360	VB2S1,S2
VB3 5' CGCTTCTCCCTGGATTCTGGAGTCC 3'	299	VB3S1
VB4 5' TTCCCATCAGCCGCCCAAACCTAA 3'	325	VB4S1
VB5 5' AAGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCC 3'	299	VB5S1,S2, S3,S5, S6, S7,S8
VB6 5' CTCTGAAGATCCAGCGCACAGAGC 3'	292	VB6S1, S3, S4, S5, S7, S11, S14
VB7 5' CCTGAATGCCCCAACAGCTCTCTC 3'	320	VB7S1, S2, S3
VB8 5' CCATGATGCGGGGACTGGAGTTGC 3'	406	VB8S1, S2, S3
VB9 5' TTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGC 3'	279	VB9S1, S2
VB10 5' CCACGGAGTCAGGGGACACAGCAC 3'	277	VB10S1
VB11 5' TGCCAGGCCCTCACATACCTCTCA 3'	276	VB11S1
VB12 5' TGTCACCAGACTGGGGAACCACCAC 3'	449	VB12S2, S3, S4
VB13 5' CACTGCGGTGTACCCAGGATATGA 3'	456	VB13S1, S2, S3, S4, S6, S7, S8,
VB14 5' GGGCTCGGCTTAAGGCAGACCTAC 3'	398	S9
VB15 5' CAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTG 3'	311	VB14S1
VB16 5' GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG 3'	279	VB15S1
VB17 5' TCCTCTCACTGTGACATCGGCCCA 3'	295	VB16S1
VB18 5' CTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCC 3'	322	VB17S1
VB19 5' TCTCAATGCCCCAAGAACGCACCC 3'	320	VB18S1
VB20 5' TGCCCCAGAATCTCTCAGCCTCCA 3'	337	VB19S1
VB21 5' TCCAGCCTGCAAAGCTTGAGGACT 3'	283	VB20S1
VB22 5' GATCCGGTCCACAAAGCTGG 3'	287	VB21S1, S3, S4
VB23 5' TGAACTGAACATGAGCTCCTTGG 3'	295	VB22S1
VB24 5' GACATCCGCTCACCAGGCCTG 3'	288	VB23S1
CB 5' CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG 3'		VB24S1

VB = Cadeia Vβ do TCR; **S** = Região S

4.9.2 Reação de elongação

Inicialmente foi realizada uma reação de PCR amplificando o segmento gênico Vβ-Cβ do TCR conforme protocolo descrito acima. O produto desta reação foi submetido à outra amplificação por PCR (reação de elongação ou *run-off*) que inclui um *primer* Cβ interno marcado com fluorocromo (FAM) [5' CAC AGC GAC CTC GGG TGG G 3'].

Para essa reação foi utilizado 1 µL de tampão para PCR 10X (500mM KCl e 100mM Tris-HCl), 0,6 µL de MgCl2 (50mM), 0,8 µL de dNTP (2,5mM), 0,5 µL de *primer* Cβ marcado (10µM), 0,04 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e água q.s.p 8µL, seguido da adição separadamente de 2µL do produto de PCR de cada uma das 24

famílias Vβ. Esta reação foi processada em termociclador por 1 minuto e 30 segundos a 94°C, seguidos de 8 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C, completados com uma extensão final de 60 minutos a 72°C.

4.9.3 Preparo das amostras e aplicação no sequenciador automático

Em seguida, foram misturados 1µl do produto da reação de PCR da reação de *run-off* , 0,3 µl de marcador de peso molecular (Gene Scan™ - 500 LIZ standard, Applied Biosystems) e 12,7 µl de tampão para carregar amostra (*loading buffer* - formamida, acrescida de *blue dextan*, 50 mg/ml e EDTA, 25 mM na proporção 5:1). Esta solução foi colocada em termociclador a 95°C por 2 minutos para completa desnaturação do produto de PCR. As amostras foram mantidas em gelo até o momento da aplicação no gel de sequenciamento, no qual as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços, sendo utilizados 14 µl de amostra/poço. Os produtos de PCR da reação de *run-off* foram submetidos à corrida eletroforética em um sequenciador automático de DNA (ABI 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

4.9.4 Perfil e cálculo do tamanho da região CDR3 do TCR e da frequência das famílias Vβ pelo método de *TCRVB CDR3 Spectratyping*

Como já visto, a região CDR3 está localizada entre os resíduos de aminoácidos 95-106 da cadeia variável β do TCR e, como a posição dos *primers* Vβ e Cβ utilizados é fixa, o tamanho observado para o produto de PCR Vβ-Cβ marcado (região CDR3) depende do tamanho da junção V-D-J de cada TCR específico. O tamanho em pares de bases do segmento CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos para cada Vβ foi estimado previamente (Pannetier *et al.*, 1993; Pannetier, Even e Kourilsky, 1995), como mostrado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Tamanho esperado do produto de PCR da amplificação Vβ-Cβ (em pares de bases) para o segmento CDR3 de 10 aminoácidos.

FAMÍLIA VB	TAMANHO DO PRODUTO (PARES DE BASES)	FAMÍLIA VB	TAMANHO DO PRODUTO (PARES DE BASES)
VB1	189	VB13	323
VB2	227	VB14	265
VB3	166	VB15	178
VB4	192	VB16	146
VB5	166	VB17	161
VB6	159	VB18	189
VB7	187	VB19	187
VB8	273	VB20	204
VB9	146	VB21	150
VB10	144	VB22	153
VB11	143	VB23	161
VB12	316	VB24	154

Os valores mostrados na **Tabela 4** foram utilizados para o cálculo de cada segmento CDR3 pelo *software Gene Mapper*™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sendo comparados com um marcador de peso molecular conjugado com fluorocromo conhecido, denominado "LIZ" (GeneScan 500 LIZ™ Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que foi aplicado junto com as amostras analisadas na eletroforese. Este marcador possui um fluorocromo diferente do utilizado na reação de *run-off* para os segmentos Vβ-Cβ, possibilitando assim a discriminação de diferentes tamanhos (em pares de bases) detectados pelo sequenciador automático. Conforme descrito, o pico de CDR3 correspondente a 10 resíduos de aminoácidos é definido por um número de pares de bases geralmente conhecido. Sendo assim, como cada 3 pares de base correspondem a 1 resíduo de aminoácido é possível definir o número de aminoácidos de cada segmento de CDR3 para uma determinada família Vβ.

Após a corrida eletroforética em sequenciador automático e análise pelo software Gene Mapper™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foram gerados gráficos de distribuição dos segmentos da região CDR3. Os gráficos (ou espectros) representam a intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias de acordo com o tamanho da região CDR3 em pares de bases. As informações geradas a partir da análise incluem o tamanho do pico (expresso em pares de bases), bem como a altura e área de cada pico. Foram considerados positivos os picos com área de intensidade de fluorescência igual ou maior que 500 unidades arbitrárias. Nos gráficos, os picos

destacados em azul correspondem ao segmento de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos, como mostrado na **Figura 2**.

A partir dos dados gerados pelo software Gene Mapper™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), foi possível analisar: as frequências de cada pico de CDR3 de cada família Vβ e a frequência total de cada família Vβ para uma determinada amostra, a distribuição dos segmentos de CDR3 em uma determinada família, o *complexity score* (CS) do repertório da cadeia Vβ do TCR e o padrão de reconstituição das famílias Vβ após o TACTH.

As frequências de cada pico de CDR3 de cada família Vβ e a frequência total de cada família Vβ para uma determinada amostra foram calculadas a partir das fórmulas %VBn = (área pico VBn/Σ área de todos VB) X 100 e %VB total = (Σ área e todos os picos VB/ Σ área de todos VB) X 100, respectivamente.

De acordo com o perfil de distribuição dos segmentos de CDR3, as famílias Vβ foram classificadas como: **A. famílias policlonais gaussianas**, famílias que apresentaram múltiplos picos (ou segmentos) de CDR3 com uma distribuição gaussiana (ou normal) dos picos. **B. famílias policlonais não gaussianas**, famílias que apresentaram múltiplos picos de CDR3 com uma distribuição anormal ou não gaussiana dos picos (distribuição "desviada" ou *skewed*; às vezes apresentando descontinuidade devido à ausência de alguns picos, formando buracos no espectro). **C. famílias oligoclonais**, famílias que apresentaram ≤ 4 picos de CDR3 com uma distribuição não gaussiana dos picos. **D. famílias monoclonais**, famílias que apresentaram somente um pico de CDR3, representando uma população em expansão clonal.

Algumas famílias Vβ não foram amplificadas em determinados períodos em alguns pacientes, e foram denominadas **famílias negativas**. Assim, nesse estudo, foi considerado um repertório restrito para uma determinada família Vβ quando foram encontrados ≤ 4 picos de CDR3, independentemente do perfil de distribuição dos picos, se gaussiano ou não gaussiano. Por outro lado, o repertório foi considerado diverso para uma determinada família Vβ quando ≥ 5 picos de CDR3 foram observados. Essas classificações foram baseadas em análises de repertório descritas na literatura (Bomberger *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000; Talvensaari *et al.*, 2002; Farge *et al.*, 2005; Muraro e Douek, 2006).

Além disso, a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada a partir de um sistema de pontuação que quantifica mudanças no repertório ao longo tempo, o cálculo do *complexity score* foi descrito por (Wu *et al.*, 2000). De acordo com

esse sistema, a complexidade dentro de cada família Vβ é determinada pela contagem do número de picos. As famílias são classificadas com uma pontuação de 0 a 8, baseada no grau de complexidade (ou diversidade). A complexidade normal é caracterizada por uma distribuição em curva Gaussiana dos diferentes tamanhos de transcritos para uma determinada família e pelo tamanho da região CDR3 (8-10 resíduos de aminoácidos) para cada família Vβ. A pontuação 0 é dada se a família é ausente, a pontuação 1 se a família Vβ apresentar somente um único pico, a pontuação 2 é dada se a família apresentar um perfil com 2 picos, a pontuação 3 se a família apresentar 3 picos, e assim sucessivamente. Finalmente, a pontuação 8 é atribuída a um *spectratype* de 8 picos ou mais, com uma aparência diversa, complexa e policlonal. Assim, o escore de complexidade geral é calculado pela soma dos escores de complexidade de cada família Vβ.

E por último, foi avaliado o padrão de reconstituição das famílias Vβ. Segundo Muraro *et al.* (2005), existem quatro padrões básicos de reconstituição do repertório da célula T, o padrão I consiste na recuperação da diversidade a partir de um repertório pré-transplante restrito, o padrão II que consiste na reconstituição da diversidade a partir de um repertório pré-transplante diverso, o padrão III consiste no reaparecimento total ou parcial de um repertório pré-transplante restrito e o padrão IV consiste na reconstituição de um repertório restrito a partir de um repertório pré-transplante diverso.

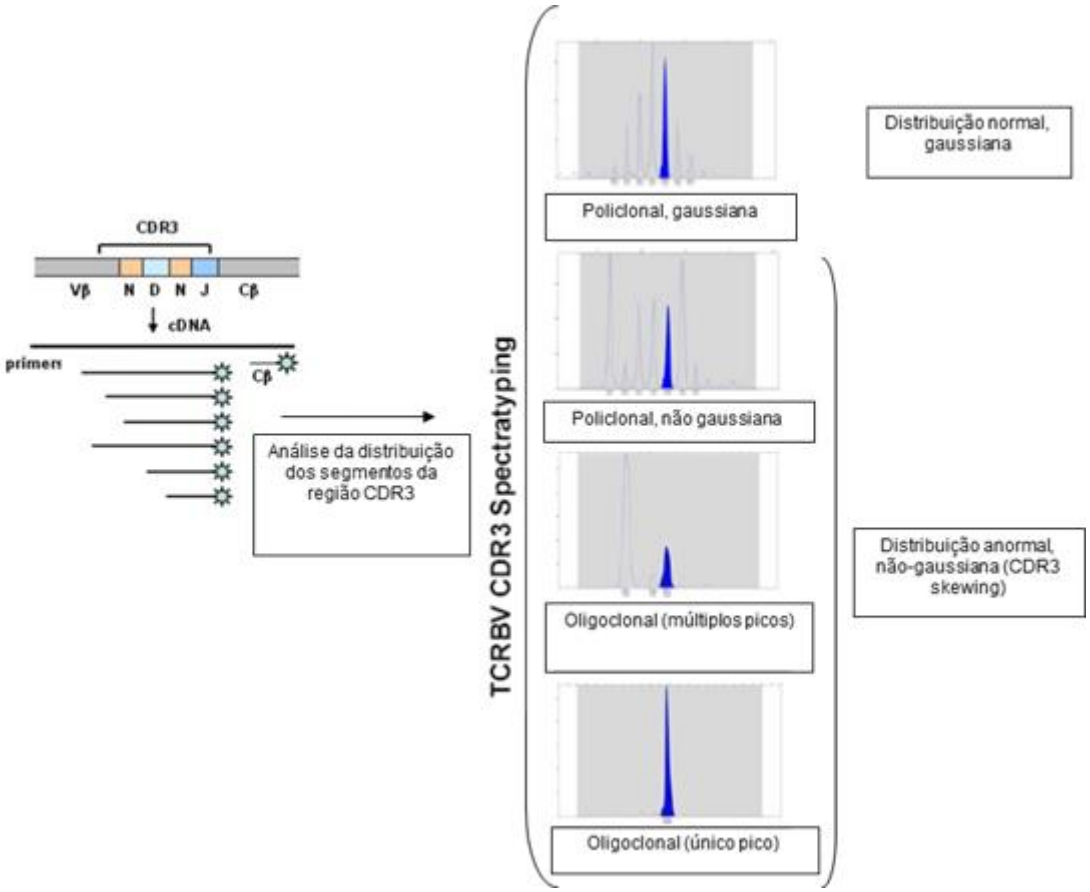


Figura 2. Representação esquemática do método TCRBV CDR3 Spectratyping e os padrões de distribuição da região CDR3 após a análise no software Gene Mapper™.

4.10 Análise Estatística

Para comparar as diferenças estatísticas entre a frequência das famílias Vβ, o número de moléculas do gene TREC e o *complexity score* nos pacientes com DM-1 no período de pré-mobilização e indivíduos do grupo controle e entre os indivíduos com DM-1 nos diversos períodos pós-transplante e o pré-transplante foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (mais de uma medida para um mesmo indivíduo) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (Schall, 1991). Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos tem distribuição normal com média 0 e variância σ^2. Nas situações em que tal pressuposto não foi observado, transformações na variável resposta serão utilizadas. Para as comparações, foi utilizado o pós-teste por contrastes ortogonais, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p valor foi menor que 5% ($p < 0,05$). Esse procedimento foi realizado através do

software SAS® 9.0 (SAS Institute Inc., SAS/STAT®, NC, USA), utilizando a PROC MIXED.

Para as correlações, foi realizada a análise de regressão linear com efeitos mistos, controlando por períodos. O coeficiente de correlação varia entre os valores -1 e 1 e quantifica a associação entre duas variáveis quantitativas. O valor 0 (zero) significa que não há relação, o valor 1 indica uma relação perfeita e o valor -1 também indica uma relação perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Esse procedimento foi realizado através do software SAS® 9.0 (SAS Institute Inc., SAS/STAT®, NC, USA), utilizando a PROC CORR. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p valor foi menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Resposta clínica dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 após o tratamento com AID/TACTH

Neste estudo, foram incluídos vinte e três pacientes com DM-1 recém-diagnosticados e que foram submetidos ao tratamento com IAD/TACTH. Destes, vinte pacientes alcançaram a independência insulínica por períodos variáveis de tempo, dezessete transitoriamente e três continuamente após o transplante. Três pacientes (DM7, DM20 e DM23) não responderam ao tratamento e continuaram insulino-dependentes durante todo o período de segmento após o transplante (**Tabela 5**).

Dentre os vinte pacientes que ficaram livres de insulina por algum período de tempo, nove pacientes (DM1, DM2, DM3, DM4, DM5, DM6, DM19, DM21 e DM22) voltaram a usar insulina durante os três primeiros anos pós-transplante (grupo DM-1<3anos; **Tabela 5**).

O paciente DM1 alcançou a independência insulínica aos 12 meses pós-transplante e manteve-se livre de insulina até 21 meses após o transplante. O paciente DM2 ficou livre do uso de insulina por dois anos e seis meses, quando teve um caso de piodermite e retomou o uso de insulina. O paciente DM3 manteve-se livre de insulina somente até 360 dias após o transplante e, a partir de então, voltou a fazer uso de insulina exógena para manter os níveis de glicose normais. O paciente DM4 ficou livre do uso de insulina no período de um ano e oito meses a dois anos e três meses pós-transplante, quando voltou a utilizar insulina. O paciente DM5 manteve-se insulino-independente por 16 meses após o transplante, quando voltou a fazer uso de insulina exógena. O paciente DM6 voltou a fazer uso de insulina 9 meses após o transplante. O paciente DM19 permaneceu livre de insulina por um ano e onze meses após o transplante, quando apresentou um quadro clínico de gripe e voltou a necessitar de insulina exógena. Os pacientes DM21 e DM22 ficaram livres do uso de insulina por 9 e 6 meses, respectivamente.

Os pacientes DM8 ao DM18 (n=11) ficaram livres de insulina por um período de tempo maior ou igual a 3 anos (grupo DM-1≥3anos;**Tabela 5**). Os pacientes DM9, DM16 e DM17 permaneceram continuamente livres de insulina até o momento dessa avaliação, por nove anos, cinco anos e oito meses, oito anos e dois meses, respectivamente (**Tabela 5**).

O paciente DM8 voltou a usar insulina somente aos cinco anos e um mês após o transplante. O DM10 manteve-se livre de insulina por três anos e oito meses, enquanto o paciente DM11 ficou livre do uso da insulina por 6 anos. O paciente DM12 ficou livre do uso de insulina por três anos e onze meses após o transplante, quando voltou a usar insulina por um período de 5 meses. Esse paciente tornou-se insulino-independente novamente após o uso de sitagliptina, mantendo-se livre de insulina até o período de seis anos e quatro meses pós-transplante, quando apresentou um quadro clínico de gripe e voltou a usar insulina definitivamente.

O paciente DM13 voltou a usar insulina exógena somente aos cinco anos e seis meses após o transplante. O paciente DM14 ficou livre de insulina por três anos e sete meses após o transplante, quando voltou a usar insulina exógena por 4 meses. Após 4 meses fazendo uso de insulina e sitagliptina, o paciente DM14 tornou-se insulino-independente novamente e manteve-se assim por mais dois anos e um mês (até o período de seis anos pós- transplante), quando também apresentou sintomas compatíveis com gripe e voltou a usar insulina definitivamente. O paciente DM15 e DM18 voltaram a utilizar insulina aos seis e cinco anos, respectivamente, após o transplante.

Vale ressaltar que os pacientes que alcançaram independência insulínica e que recaíram, atualmente, fazem uso de doses baixas de insulina para controle glicêmico (Couri *et al.*, 2009).

Tabela 5. Características clínico-demográficas dos pacientes com DM-1 no período pré-transplante e a avaliação da resposta clínica após a terapia de imunossupressão em altas doses seguida do TACTH.

Número	Paciente	Tipo de HLA	Sexo/ idade (anos)	Anticorpo anti-GAD65 (Ul/ml) Pré-Tx	Dose inicial de insulina (Ul/Kg/dia)	Data do transplante	Resposta clínica			
							D+360	D+720	D+1080	D+1800
DM1	**CTO**	**A3**	F/17	44,0	0,29	10-10-05	**RM**	RC	RC	RC
DM2	**FCC**	**A2**	M/15	5,3	056	20-07-07	**RM**	**RM**	RC	RC
DM3	**VTR**	*	M/16	11,0	0,13	22-11-05	**RM**	RC	RC	RC
DM4	**TAS**	**A2/A3**	F/20	4,0	0,44	25-05-05	**RM**	**RM**	RC	RC
DM5	**GBA**	*****	M/15	29,0	0,49	09-10-07	**RM**	RC	RC	RC
DM6	**LTF**	**A2/A3**	M/17	21,1	0,44	28-08-06	**RM**	RC	RC	RC
DM7	**MTM**	**A2**	M/18	38,2	0,49	20-12-07	AR	AR	AR	AR
DM8	**PMR**	**A2**	F/18	102,0	0,35	20-09-05	**RM**	**RM**	**RM**	**RM**
DM9	**WSL**	**A3**	M/21	1,1	0,27	03-05-04	**RM**	**RM**	**RM**	**RM**
DM10	**RAOA**	**A2**	M/17	48,0	0,55	12-09-05	**RM**	**RM**	**RM**	RC
DM11	**RRS**	*	M/24	24,0	0,58	05-06-06	**RM**	**RM**	**RM**	**RM**
DM12	**ALSR**	**A3**	M/28	49,0	0,34	15-03-04	**RM**	**RM**	**RM**	RC
DM13	**JFA**	**A3**	M/31	37,0	0,37	17-07-06	**RM**	**RM**	**RM**	**RM**
DM14	**MGB**	**A2**	M/15	22,0	0,23	05-07-04	**RM**	**RM**	**RM**	RC
DM15	**ISJ**	*	F/15	11,0	0,45	02-05-06	**RM**	**RM**	**RM**	**RM**
DM16	**HFG**	**A2**	M/18	12,0	0,21	10-08-07	**RM**	**RM**	**RM**	**RM**
DM17	**RLFS**	**A2/B7**	M/16	51,0	0,38	03-02-05	**RM**	**RM**	**RM**	**RM**
DM18	**CPS**	**A2/B7**	M/16	17,0	0,42	03-05-05	**RM**	**RM**	**RM**	RC
DM19	**TDP**	**A2**	M/21	7,0	0,59	10-08-07	**RM**	RC	RC	RC
DM20	**MQS**	*****	M/15	1,1	0,50	05-11-07	AR	AR	AR	AR
DM21	**TKF**	**A2**	F/22	10,0	0,33	31-03-08	RC	RC	RC	RC
DM22	**MSG**	**A2/A3**	M/22	14,0	0,54	09-06-08	RC	RC	RC	RC
DM23	**ECP**	**A3**	F/16	-	-	24-05-10	AR	AR	AR	AR

* Não possuem haplotipo HLA-A2, HLA-A3 ou HLA-B7; **M:** sexo masculino; **F:** sexo feminino; **GAD65:** ácido glutâmico descarboxilase. Resultados foram considerados positivos se GAD65 > 1,0 UI/ml; **Pré-Tx:** período pré-transplante; **Remissão clínica (Rm):** independência insulínica; **Recaída (Rc):** reinicio do uso de insulina; **Ausência de resposta (AR):** pacientes não responderam ao transplante. D+360, D+720, D+1080, D+1800: 360, 720, 1080, 1800 dias pós-transplante.

Os níveis de peptídeo-C sérico foram dosados pré-transplante e em vários períodos pós-transplante pelo Laboratório de Diabetes e Metabolismo do HC-FMRP-USP. De modo geral, os níveis de peptídeo-C aumentaram nos pacientes nos dois primeiros anos após o transplante, exceto nos pacientes DM7, DM20 e DM22. Vale ressaltar que os pacientes DM7 e DM20 não responderam ao tratamento, e o paciente DM22 voltou a usar insulina 6 meses após o TACTH **(Tabelas 5 e 6)** (Couri *et al.*, 2009).

Tabela 6. Peptídeo C dos pacientes com DM-1 antes e diversos períodos após o TACTH.

NÚMERO	PACIENTE	PEPTÍDEO C AUC ng/mL (por 2 horas)						
		PRÉ-TX	D+180	D+360	D+720	D+1080	D+1440	D+1800
DM1	**CTO**	80,21	150,45	258,31	-	614,95	454,08	462,69
DM2	**FCC**	477,19	775,83	635,80	383,86	165,41	141,84	189,88
DM3	**VTR**	79,76	136,40	83,38	-	-	-	-
DM4	**TAS**	10,88	172,20	211,18	382,48	233,84	219,79	308,61
DM5	**GBA**	496,68	658,00	340,33	452,27	382,93	246,10	249,70
DM6	**LTF**	85,65	285,95	460,42	496,22		420,54	205,29
DM7	**MTM**	816,62	-	57,55	19,94	134,59	79,76	12,24
DM8	**PMR**	32,63	244,26	520,69	909,52	790,79	516,16	457,25
DM9	**WSL**	77,49	157,25	462,23	181,27	-	182,63	-
DM10	**RAOA**	29,91	158,16	422,36	541,99	-	292,75	518,43
DM11	**RRS**	216,16	252,42	422,81	467,22	410,12	208,46	241,99
DM12	**ALSR**	51,66	63,44	107,40	73,87	470,39	135,95	530,21
DM13	**JFA**	130,06	818,43	856,95	1481,42	653,47	632,63	330,81
DM14	**MGB**	134,59	201,66	639,88	701,06	812,54	829,76	645,77
DM15	**ISJ**	29,46	666,16	572,36	1188,22	648,49	728,70	353,02
DM16	**HFG**	429,61	-	578,25	608,16	444,56	250,60	244,71
DM17	**RLFS**	173,56	972,51	318,13	719,92	721,90	825,23	585,04
DM18	**CPS**	163,59	648,94	130,51	746,37	676,59	426,43	259,67
DM19	**TDP**	448,19	611,78	532,93	127,34	157,70	87,01	-
DM20	**MQS**	124,62	98,34	75,23	129,60	66,62	-	-
DM21	**TKF**	405,59	520,24	528,85	196,22	91,09	103,32	-
DM22	**MSG**	355,29	198,49	277,79	112,39	-	124,62	-
DM23	**ECP**	244,71	-	223,41	217,52	157,70	-	-

* A quantificação dos níveis séricos do peptídeo-C foi realizada utilizando o *Human C-Peptide radioimmunoassay kit* (Millipore,USA). **AUC**: área sob a curva.

5.2 Quantificação absoluta do gene TREC em células mononucleares isoladas de sangue periférico

Os resultados obtidos a partir da quantificação absoluta do gene TREC (número de moléculas ou cópias do gene/100 ng de DNA) nas células mononucleares de sangue

periférico de indivíduos sadios (grupo controle) e de pacientes com DM-1 (pré e em vários períodos pós-transplante) podem ser observados nas **Figuras 3, 4** e **5**.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo de indivíduos sadios (0,00589 ± 0,00711) aos pacientes com DM-1 no período pré-transplante (0,00340 ± 0,00190) (**Figura 3**).

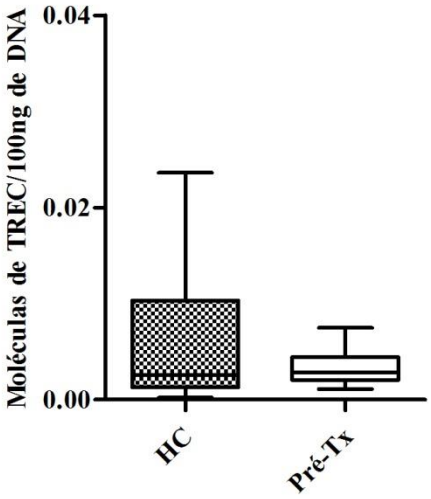


Figura 3. Número de moléculas de TREC em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios e dos pacientes com DM-1 antes do TACTH. HC: indivíduos sadios; **Pré-Tx:** período pré-transplante.

Na **Figura 4**, pode ser observado que houve diminuição significativa no número de cópias do gene TREC nas células mononucleares dos pacientes com DM-1 cem dias após o TACTH (0,00038 ± 0,00032) quando comparados ao período pré-transplante (média 0,00340 ± 0,00190).

Diferenças estatísticas foram encontradas nos níveis de TREC quando comparado os períodos D+540 (0,01136 ± 0,01386), D+720 (0,01207 ± 0,01132), D+900 (0,00944 ± 0,00420), D+1080 (0,01310 ± 0,01306), D+1440 (0,01251 ± 0,00903), D+1620 (0,01543 ± 0,02060) e D+1800 (0,01545 ± 0,01220) ao pré-transplante, indicando aumento significativo do número de moléculas de TREC nos pacientes com DM-1 a partir de 1 ano e 6 meses após o TACTH e que persistiu até o período D+1800 (**Figura 4**).

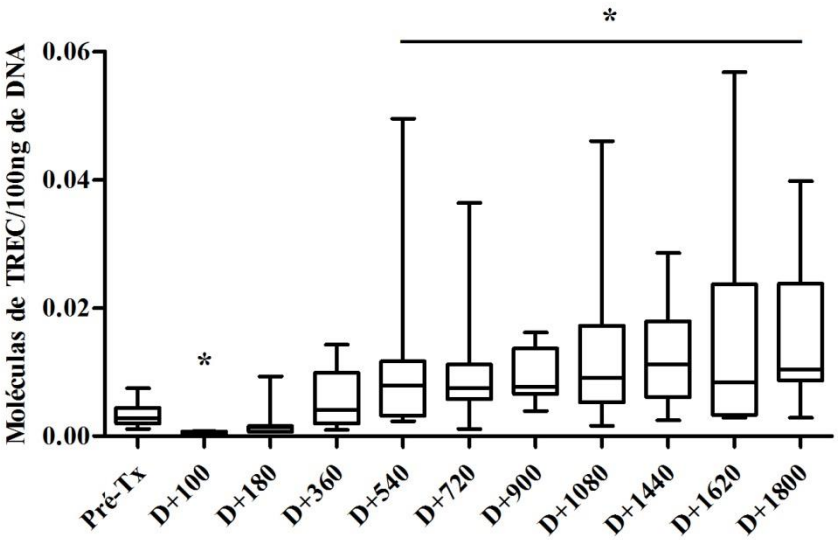


Figura 4. Número de moléculas de TREC em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após o TACTH. Pré-Tx: período pré-transplante. (*) $p < 0,05$

Quando os pacientes foram divididos em grupos de acordo com a resposta clínica (grupo DM-1<3anos e DM-1≥3anos), foi observada uma redução estatisticamente significativa do número de moléculas de TREC cem dias após o transplante em ambos os grupos quando comparado ao pré-transplante ($p<0,05$) (**Figura 5**).

No grupo DM-1<3anos, foi evidenciado um aumento significativo das moléculas de TREC nos períodos D+540, D+720, D+1080, D+1620 e D+1800 quando comparados ao pré-transplante. Já no grupo DM-1≥3anos, foram encontradas diferenças estatísticas nos períodos D+540, D+720, D+900, D+1080, D+1440, D+1620 e D+1800 pós-transplante em comparação ao pré-transplante, indicando aumento dos níveis de TREC em ambos os grupos após o TACTH (**Figura 5**).

Quando comparados os grupos entre si, foi possível observar que somente no período D+100 houve diferença estatística ($p<0,05$), onde o grupo DM-1<3anos apresentou maior número de moléculas de TREC (0,00071 ± 0,00005) que o grupo DM-1≥3anos (0,00013 ± 0,00011) (**Figura 5**).

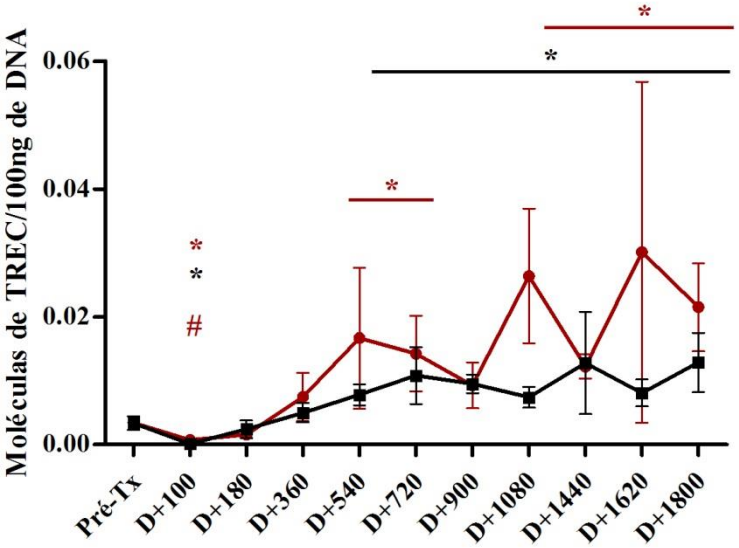


Figura 5. Número de moléculas de TREC em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após TACTH. Em vermelho estão representados os pacientes com DM-1 que recaíram antes de completarem 3 anos de transplante (grupo DM-1<3anos) e em preto estão representados os pacientes que ficaram livres de insulina por 3 anos ou mais após o transplante (grupo DM-1≥3anos). O símbolo (*) em preto representa diferenças estatísticas entre o pré-transplante e os diversos períodos pós-transplante no grupo DM-1≥3anos; o símbolo (*) em vermelho representa diferenças estatísticas entre o pré-transplante e os diversos períodos pós-transplante no grupo DM-1<3anos; o símbolo (#) representa diferenças estatísticas entre os grupos DM-1<3anos e DM-1≥3anos. **Pré-Tx:** período pré-transplante. (*)$p<0,05$, (*)$p<0,05$e (#)$p<0,05$

5.3 Análise do repertório de células T dos pacientes com DM-1 antes e após o TACTH e de indivíduos sadios

5.3.1 *Complexity Score*

Conforme descrito no Item 4.9.4, a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada por um sistema de pontuação denominado *complexity score* (CS; escore de complexidade) e as **Figuras 6**, **7** e **8** demonstram os resultados encontrados.

Quando comparada a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR de indivíduos sadios à diversidade do repertório de pacientes com DM-1 no período pré-transplante, não foi encontrada diferença significativa, indicando que os pacientes com DM-1 recém-diagnosticados possuem um repertório de células T diverso (**Figura 6**).

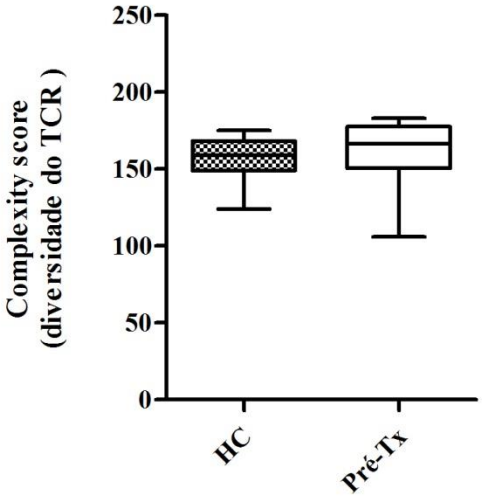


Figura 6. Diversidade do receptor da célula T (*complexity score*) dos indivíduos sadios e dos pacientes com DM-1 antes do TACTH. HC: indivíduos sadios; **Pré-Tx:** período pré-transplante; **TCR:** receptor da célula T.

Como pode ser visto na **Figura 7**, houve redução estatisticamente significativa do CS dos pacientes com DM-1 no período D+180 (média 134,41 ± 40,56) quando comparado ao pré-transplante (158,78 ± 10,33). Nos períodos D+360 (148,78 ± 26,64) e D+720 (149,65 ± 22,67) houve o aumento do CS, porém esse aumento não foi estatisticamente diferente do pré-transplante. Além disso, os CS dos períodos D+540 (139,89 ± 27,51), D+900 (127,73 ± 30,74), D+1080 (126,55 ± 29,70), D+1260 (121,55 ± 21,13), D+1440 (119,00 ± 26,26), D+1620 (113,00 ± 37,48) e D+1800 (103,77 ± 17,85) estavam estatisticamente diminuídos quando comparados ao período pré-transplante (**Figura 7**).

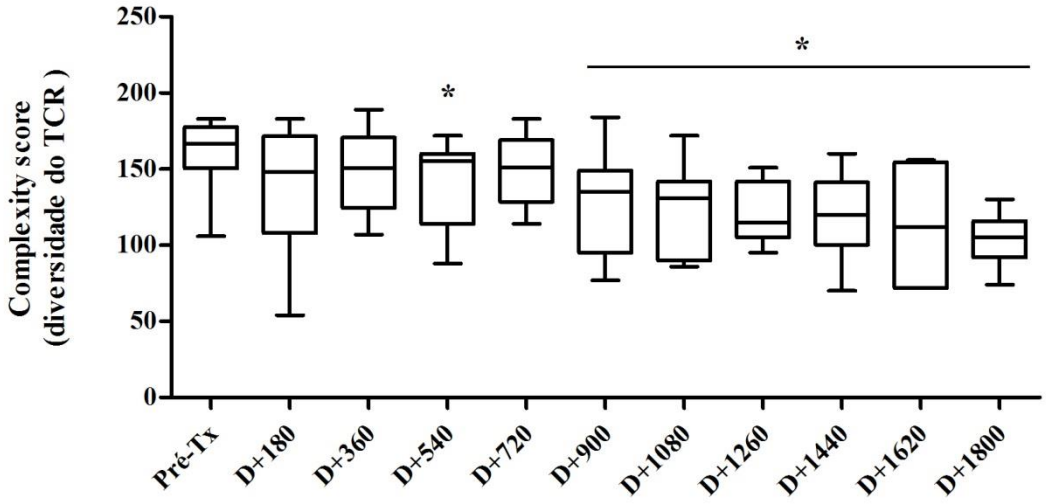


Figura 7. Diversidade do receptor da célula T (*complexity score*) dos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após o TACTH. Pré-Tx: período pré-transplante; **TCR:** receptor da célula T. (*) $p < 0,05$

Paralelamente, também foram avaliados os escores de complexidade dos dois grupos de pacientes com DM-1 divididos de acordo com a resposta clínica (DM-1<3anos e DM-1≥3anos), contudo diferenças estatísticas não foram encontradas entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados (**Figura 8**).

No grupo DM-1<3anos, os CS dos períodos D+180, D+900, D+1260, D+1440, D+1620 e D+1800 estavam significativamente diminuídos em relação ao CS do período pré-transplante (**Figura 8**). No grupo DM-1≥3anos, os CS dos períodos D+900 ao D+1800 apresentaram redução significativa quando comparado ao pré-transplante (**Figura 8**).

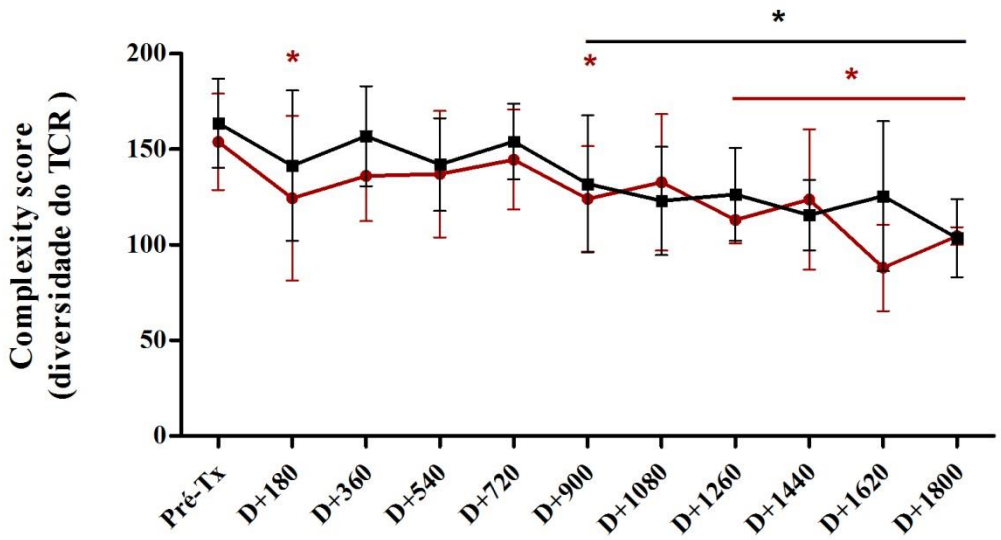


Figura 8. Diversidade do receptor da célula T (*complexity score*) dos pacientes com DM-1 antes e em vários períodos após o TACTH. Em vermelho estão representados os pacientes com DM-1 que recaíram antes de completarem 3 anos de transplante (grupo DM-1<3anos) e em preto estão representados os pacientes que ficaram livres de insulina por 3 anos ou mais após o transplante (grupo DM-1≥3anos). O símbolo (*) em preto representa diferenças estatísticas entre o pré-transplante e os diversos períodos pós-transplante no grupo DM-1≥3anos; o símbolo (*) em vermelho representa diferenças estatísticas entre o pré-transplante e os diversos períodos pós-transplante no grupo DM-1<3anos. **Pré-Tx:** período pré-transplante. (*)p<0,05 e (*)p<0,05

5.3.2 Perfil de distribuição dos segmentos de CDR3 das famílias Vβ do TCR

Conforme descrito no Item 4.9.4, os segmentos de CDR3 gerados durante o processo de recombinação V(D)J podem apresentar tamanhos variados e tais segmentos podem apresentar diferentes perfis de distribuição. Esses segmentos podem apresentar um perfil policlonal normal com distribuição gaussiana, com segmentos variando entre 4 a 16 resíduos de aminoácidos, sendo os tamanhos de 8 a 10 aminoácidos os mais frequentes. Porém, os segmentos de CDR3 podem ser distribuídos em perfis diferentes do perfil policlonal normal com distribuição gaussiana, apresentando uma distribuição policlonal anormal não gaussiana, ou um perfil oligoclonal (com poucos picos de CDR3) ou um perfil monoclonal (pico único de CDR3).

As **Figuras 9, 10** e **11** mostram exemplos de repertórios de células T de dois pacientes com DM-1 e de um indivíduo sadio, sendo que as figuras com o repertório de células T de todos os pacientes e indivíduos sadios podem ser vistas no CD em anexo (**Figuras B.1-B.30**). Nessas figuras podem ser observados os diferentes perfis de distribuição dos picos de CDR3.

Na **Figura 9** está demonstrado o repertório das células T com o perfil de distribuição dos picos de CDR3 do paciente DM8 (pertencente ao grupo de pacientes que permaneceram livres de insulina por mais de três anos), o qual ficou livre do uso de insulina por mais de cinco anos após o transplante. A **Figura 10** mostra o repertório do paciente DM2 (pertencente ao grupo de pacientes que permaneceram livres de insulina por menos de três anos), o qual voltou a fazer uso de insulina exógena dois anos e seis meses pós-TACTH após um caso de piodermite.

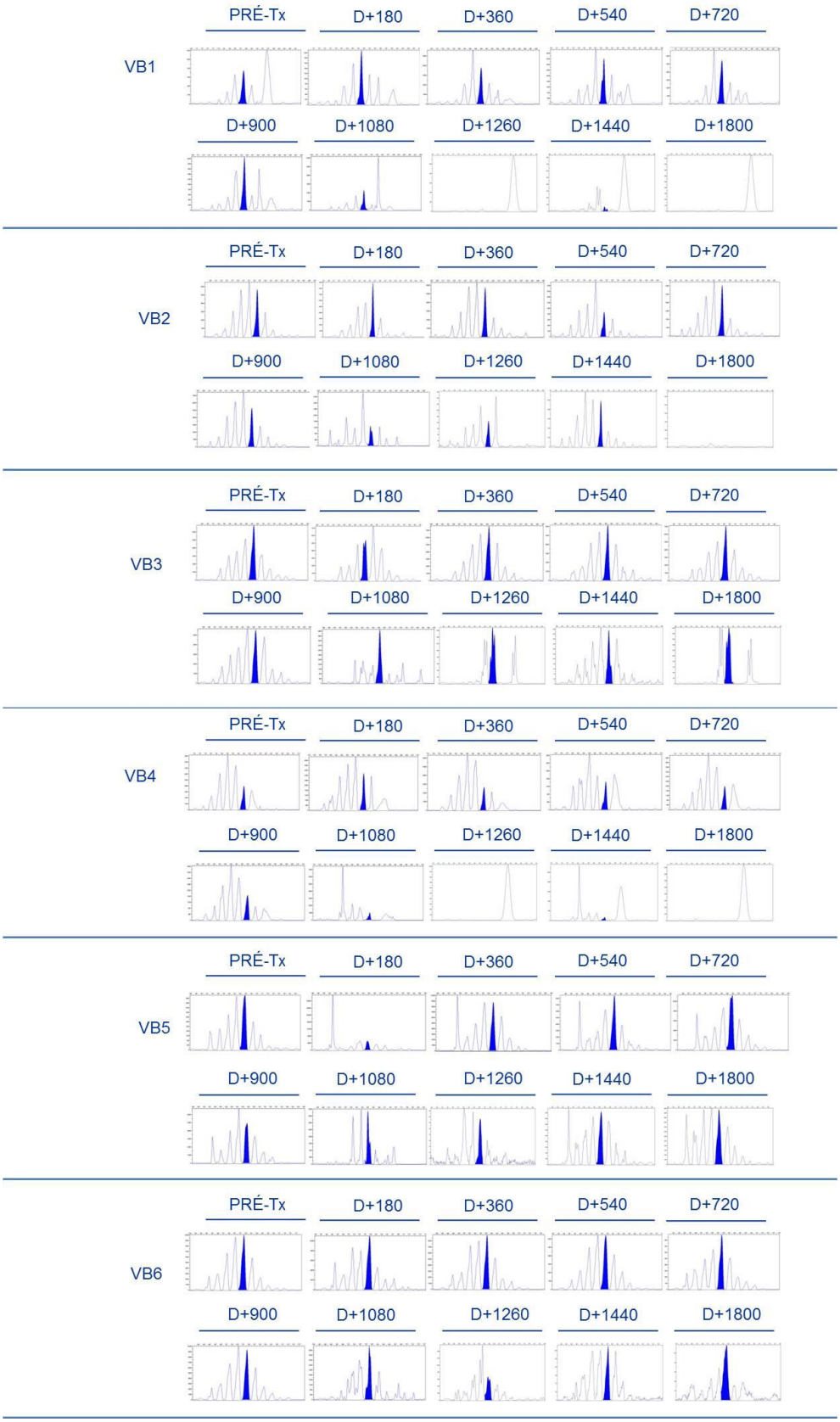
No repertório do paciente DM8 pode ser vista a distribuição mais diversa dos picos de CDR3 antes e após o transplante, com várias famílias Vβ apresentando distribuição policlonal (gaussiana e não gaussiana). O repertório do paciente DM2 também apresentou algumas famílias Vβ com distribuição policlonal gaussiana antes do transplante e que aumentaram um ano após o transplante. Porém, observa-se maior número de famílias Vβ com distribuição oligoclonal e monoclonal no repertório do paciente DM2 após o TACTH (**Figura 9** e **10**).

No repertório de células T do indivíduo sadio, pode ser observado que, exceto pelas famílias Vβ19 e 24, todas as outras famílias Vβ apresentaram distribuição policlonal (gaussiana ou não gaussiana) (**Figura 11**).

Como exemplo de famílias Vβ com distribuição policlonal gaussiana, tem-se a família Vβ2 nos períodos pré-transplante e D+720 do paciente DM8, a família Vβ5 no período pré-transplante do paciente DM8 e a família Vβ6 no período D+540 desse mesmo paciente (**Figura 10**).

Nas famílias Vβ2 (no período D+180) e Vβ9 (no período D+900) do paciente DM2 pode ser observado o padrão de distribuição policlonal não gaussiano (**Figura 9**). As famílias Vβ3 (no período D+180 e D+540) do paciente DM2 e Vβ22 (no período D+1080) do paciente DM8 apresentam o padrão de distribuição oligoclonal (**Figuras 9-10**).

As famílias Vβ1 (no período D+180) e Vβ4 (no pré-transplante) do paciente DM2 apresentam o padrão de distribuição monoclonal, enquanto a famílias Vβ23 e Vβ12 (no período D+1080) do paciente DM8 são exemplos de famílias que tiveram a expressão ausente (**Figuras 9-10**).


VB1
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB2
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB3
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB4
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB5
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB6
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800

VB7
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB8
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB9
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB10
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB11
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB12
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800

VB13
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB14
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB15
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB16
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB17
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800
VB18
PRÉ-Tx
D+180
D+360
D+540
D+720
D+900
D+1080
D+1260
D+1440
D+1800

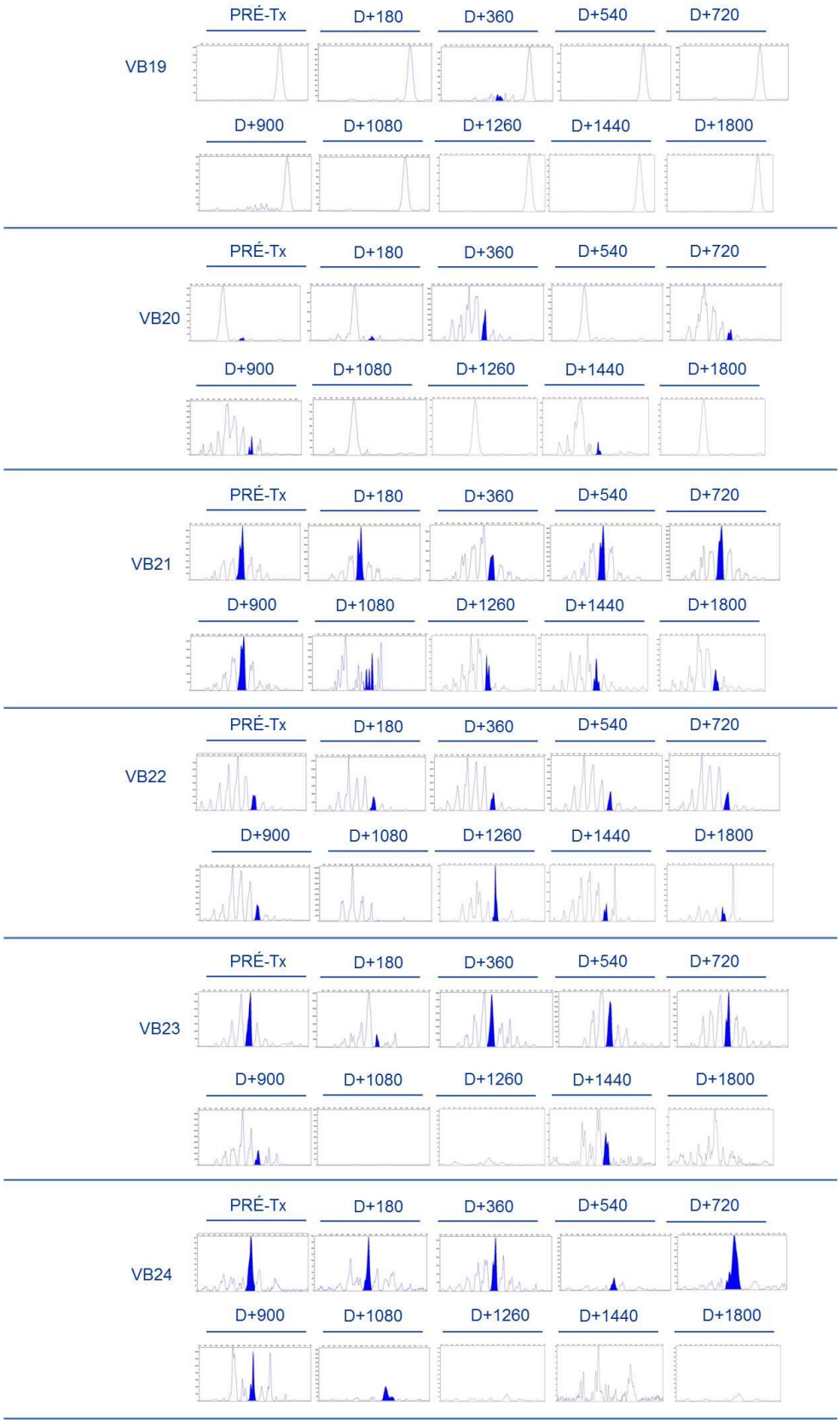
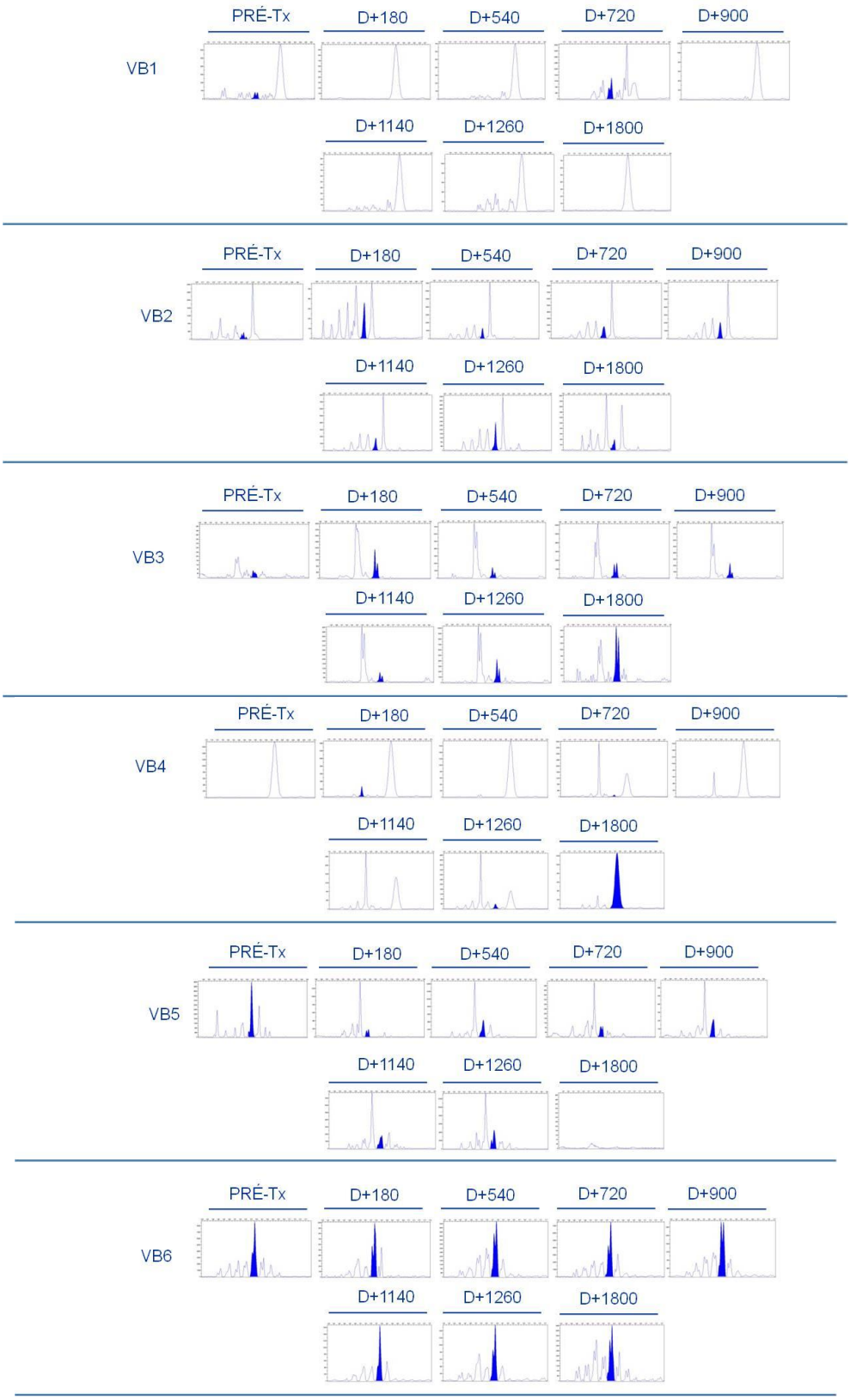
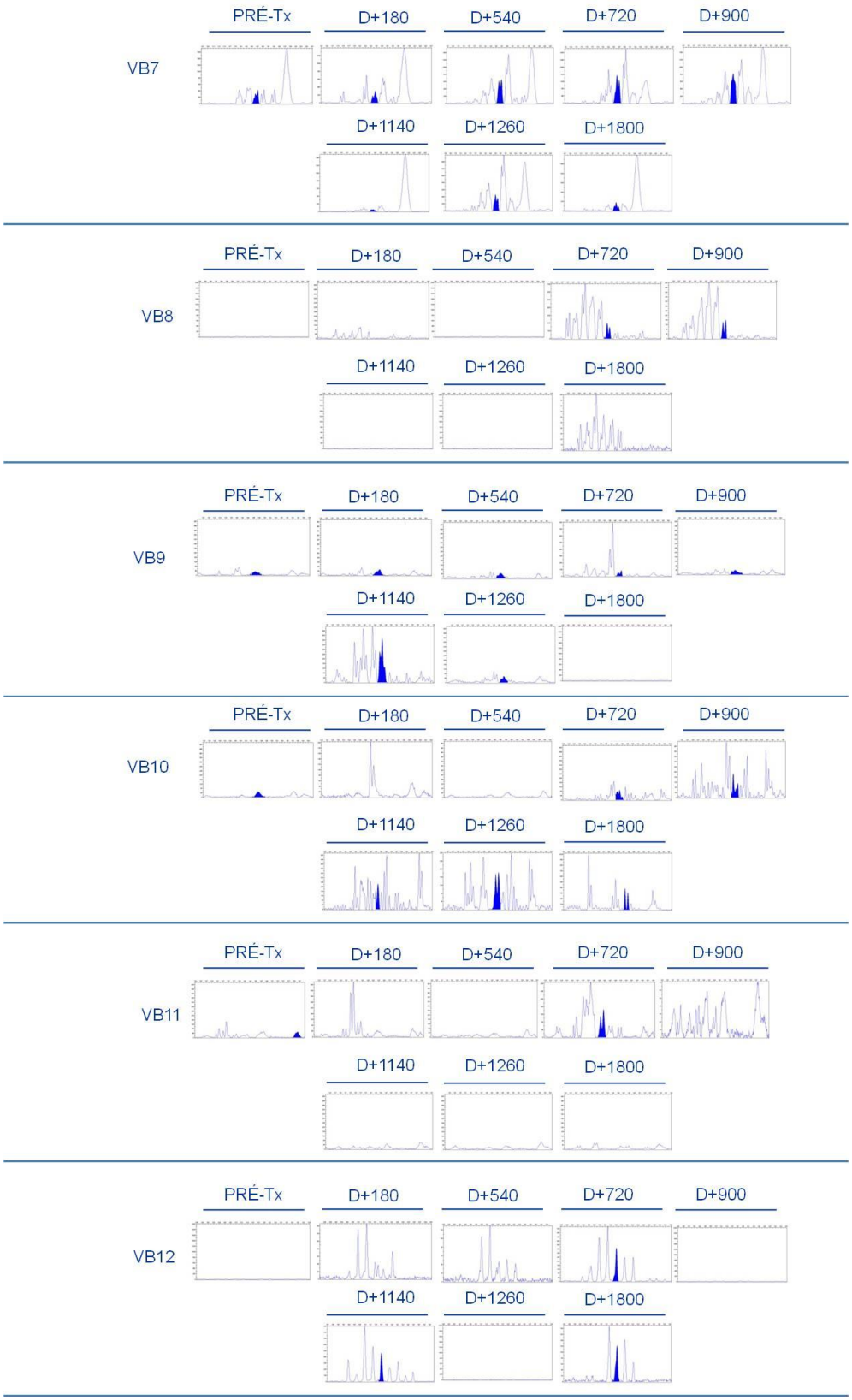
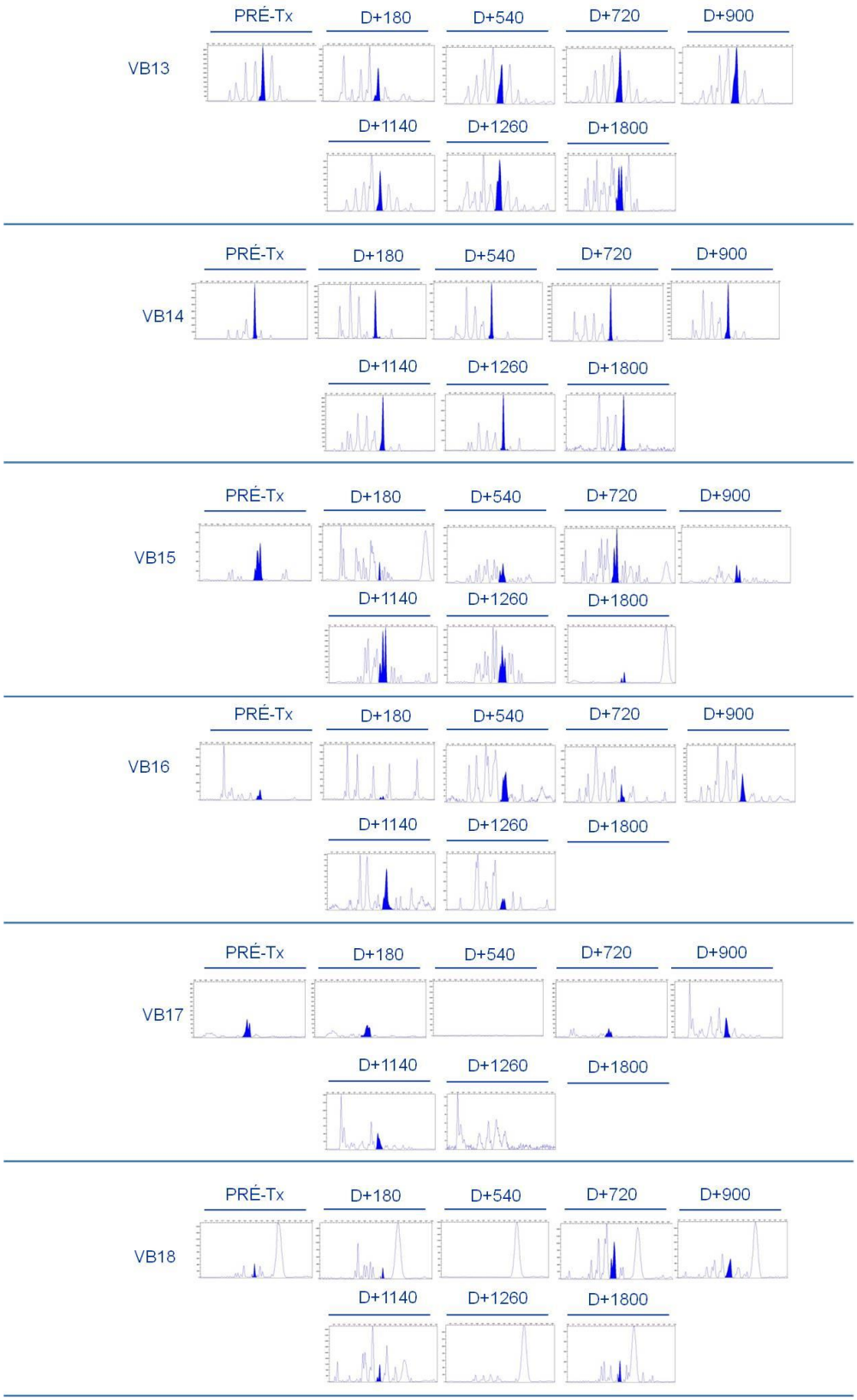


Figura 9. Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T do sangue periférico do paciente PMR (DM8) pré e pós-TACTH. Cada gráfico representa a intensidade de fluorescência, que é proporcional ao número de transcritos para a família Vβ, em unidades arbitrárias (eixo Y), em função do comprimento da região CDR3, em pares de bases (eixo X). Os picos destacados em azul em cada gráfico correspondem ao tamanho de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.


VB1
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB2
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB3
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB4
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB5
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB6
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800


VB7
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB8
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB9
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB10
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB11
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB12
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800


VB13
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB14
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB15
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB16
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB17
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800
VB18
PRÉ-Tx
D+180
D+540
D+720
D+900
D+1140
D+1260
D+1800

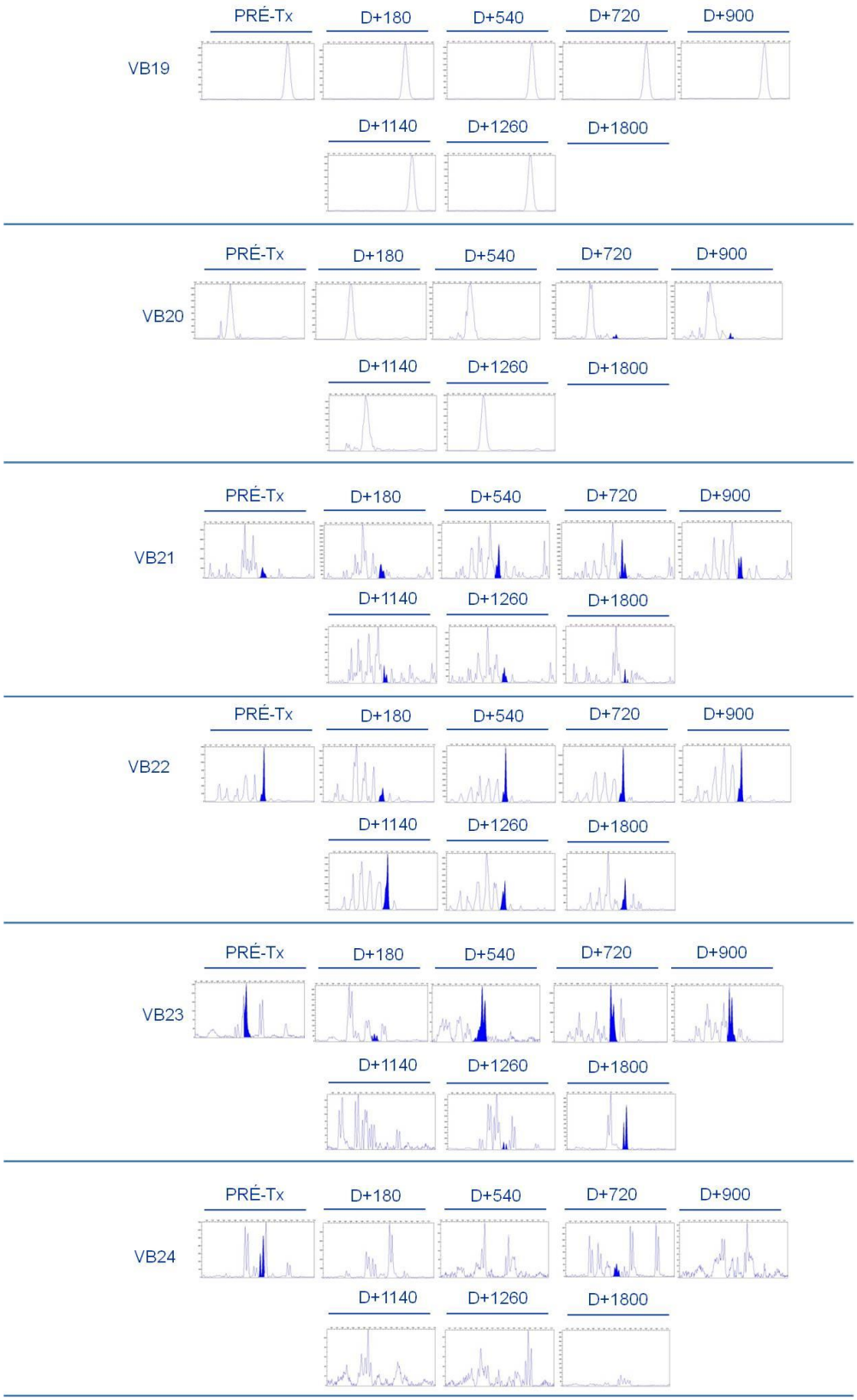


Figura 10. Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T do sangue periférico do paciente FCC (DM2) pré e pós-TACTH. Cada gráfico representa a intensidade de fluorescência, que é proporcional ao número de transcritos para a família Vβ, em unidades arbitrárias (eixo Y), em função do comprimento da região CDR3, em pares de bases (eixo X). Os picos destacados em azul em cada gráfico correspondem ao tamanho de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.

Figura 11. Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T do sangue periférico do indivíduo sadio JTCA (controle 4). Cada gráfico representa a intensidade de fluorescência, que é proporcional ao número de transcritos para a família Vβ, em unidades arbitrárias (eixo Y), em função do comprimento da região CDR3, em pares de bases (eixo X). Os picos destacados em azul em cada gráfico correspondem ao tamanho de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.

5.3.3 Análise da diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH

A diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH foi analisada e sumarizada nas **Tabelas 7-9.**

Famílias Vβ com distribuição policlonal predominaram antes do transplante nos pacientes com DM-1. Durante os dois primeiros anos pós-transplante, o número dessas famílias Vβ policlonais apresentou pequena redução ou manteve-se igual em alguns pacientes, porém em outros pacientes houve um aumento do número dessas famílias, indicando maior diversidade do repertório de células T.

O número de famílias Vβ com distribuição oligoclonal e monoclonal, tanto no grupo DM-1<3anos como no DM-1≥3 anos, aumentou nos períodos mais tardios após o transplante (D+1080-D+1800) quando comparados com o período pré-transplante (**Tabela 7-9**).

Foi observado que aos 360 dias após o TACTH, o número de famílias Vβ com distribuição policlonal (gaussiana ou não) aumentou em cinco pacientes (DM6, DM8, DM12, DM15 e DM16), diminuiu em dez pacientes (DM1, DM3, DM4, DM5, DM7, DM9, DM10, DM13 e DM21) e manteve-se igual em três (DM11, DM 14 e DM19) quando comparado ao pré-transplante (**Tabela 7-9**).

No D+720 pós-transplante, o número de famílias Vβ com distribuição policlonal (gaussiana ou não) aumentou em cinco (DM2, DM4, DM7, DM12 e DM15), diminuiu em oito pacientes (DM5, DM6, DM10, DM11, DM16, DM19, DM21 e DM23) e manteve-se igual em quatro pacientes (DM1, DM3, DM4, DM8 e DM13) quando comparado ao pré-transplante (**Tabela 7-9**).

Três anos após o TACTH (D+1080), o número de famílias Vβ policlonais aumentou em somente dois pacientes (DM2 e DM7), manteve-se igual em um paciente (DM5), enquanto nove pacientes (DM1, DM8, DM11, DM12, DM13 DM14, DM15 e DM21) apresentaram redução no número dessas famílias. Nos períodos de quatro e cinco anos pós-transplante, todos os pacientes analisados apresentara redução do número de famílias Vβ policlonais quando comparado ao pré-transplante (**Tabela 7-9**).

5.3.3.1 Grupo de pacientes que ficaram livres de insulina por período menor que três anos pós-transplante

O paciente DM1 apresentou apenas uma família com expansão oligoclonal e três em expansão monoclonal antes do transplante e esses números se mantiveram praticamente os mesmos até dois anos pós-transplante, período no qual o paciente já havia retomado o uso de insulina (voltou a usar insulina 21 meses após o transplante). Porém, no período D+1080, o número de famílias oligoclonais aumentou para nove e o de famílias monoclonais aumentou para cinco nesse paciente (**Tabela 7**).

No paciente DM2, houve o aumento de famílias com distribuição policlonal não gaussiana dois anos após o transplante, acompanhado pela redução no número de famílias com expansão oligoclonal e monoclonal. Esses números mantiveram-se similares aos três anos pós-transplante, período no qual o paciente já fazia uso de insulina exógena novamente (retomou o uso de insulina 2 anos e 6 meses após o transplante). Entretanto, cinco anos após o transplante (D+1800), o número de famílias com expansão oligoclonal aumentou enquanto o número de famílias com distribuição policlonal não gaussiana diminuiu quando comparado ao período D+720 (**Tabela 7**).

O paciente DM3 mostrou uma redução no número de famílias policlonais não gaussiana e aumento das famílias oligoclonais e negativas no período D+360 pós-transplante (período em que voltou a usar insulina). No período D+720, recuperou um padrão de distribuição das famílias semelhante ao do pré-transplante, com aumento de famílias com distribuição policlonal gaussiana (**Tabela 7**).

O paciente DM4 ficou livre do uso de insulina entre um ano e oito meses a dois anos e três meses após o transplante. Um ano após o transplante, esse paciente apresentou uma pequena redução no número de famílias policlonais não gaussianas, acompanhada pelo aumento das famílias oligoclonais, monoclonais e negativas. Entretanto, aos dois anos pós-transplante foi observado o aumento do número de famílias com distribuição policlonal (de 20 para 23), quando comparado ao pré-transplante. Além disso, o paciente não apresentou famílias em expansão oligoclonal nesse mesmo período. Porém, no período D+1800, o número de famílias policlonais não gaussianas diminuiu (n=12) e o de famílias oligoclonais (n=4) e monoclonais (n=5) aumentou, além de serem observadas famílias com expressão negativa (n=3) (**Tabela 7**).

No paciente DM5, o qual voltou a utilizar insulina exógena 16 meses após o TACTH, o número de famílias policlonais não gaussianas diminuiu nos períodos D+360 e D+720 pós-transplante quando comparados com o pré-transplante, enquanto o número de famílias oligoclonais e negativas aumentaram nesses mesmos períodos. Nos períodos D+1440 e D+1080, houve um aumento de famílias policlonais não gaussianas, tanto em comparação ao pré-transplante quanto aos períodos iniciais pós-transplante. O paciente DM5 também apresentava três famílias com distribuição policlonal gaussiana antes do transplante as quais não assumiram a mesma distribuição policlonal normal após o transplante (**Tabela 7**).

O paciente DM6 retomou o uso de insulina 9 meses pós-transplante. Um ano após o TATCH, apresentou um padrão de distribuição das famílias Vβ similar ao do pré-transplante, com várias famílias com distribuição policlonal gaussiana. Porém, apresentou uma redução do número de famílias policlonais e um aumento de famílias oligoclonais e negativas no período D+720, como pode ser observado na **Tabela 7**. Nos períodos D+1440 e D+1800, o número de famílias policlonais continuou diminuindo, enquanto que o número de famílias com distribuição oligoclonal e monoclonal aumentou (**Tabela 7**).

O paciente DM19 apresentou duas famílias com expressão negativa antes do transplante. No período D+360 pós-transplante, não houve famílias sem expressão, o número de famílias policlonais gaussianas manteve-se o mesmo (n=17) e o número de famílias oligoclonais e monoclonais aumentou. Esse paciente retomou o uso de insulina um ano e onze meses pós-transplante. Dois anos após o TACTH houve a redução do número de famílias policlonais, o aumento de famílias oligoclonais e monoclonais e reaparecimento de uma família com expressão negativa (**Tabela 9**).

No paciente DM21, houve redução no número de famílias policlonais gaussianas e não gaussianas um ano após o transplante, além do aumento das famílias oligo e monoclonais. No período D+720, o número de famílias policlonais gaussianas e não gaussianas continuou diminuindo e o de famílias oligoclonais e negativas aumentou. Nos períodos D+1080 e D+1440 houve o reaparecimento de duas famílias com distribuição policlonal gaussiana. Esse paciente retomou o uso de insulina nove meses após o transplante (entre o período D+720 e D+1080) (**Tabela 9**).

O paciente DM22 apresentou pouca variação no número de famílias policlonais, oligoclonais e monoclonais entre os períodos D+1440 e pré-transplante. Nesse período

observou-se uma redução do número de famílias negativas quando comparado ao pré-transplante (**Tabela 9**). Esse paciente voltou a usar insulina após 6 meses de transplante.

5.3.3.2 Grupo de pacientes que ficaram livres de insulina por período maior ou igual a 3 anos pós-transplante

O paciente DM8 apresentou um aumento do número de famílias com distribuição policlonal não gaussiana no período D+720, acompanhado pela redução de famílias policlonais gaussianas. Porém, aos três anos pós-transplante, o número de famílias oligoclonais aumentou enquanto que o número de famílias policlonais não gaussianas reduziu e manteve-se igual nos períodos D+1440 e D+1800 pós-transplante. Esse paciente retomou o uso de insulina após o período D+1800 (**Tabela 7**).

No paciente DM9, o qual se manteve livre do uso de insulina durante todo o seguimento avaliado, foi observado o aparecimento de duas famílias policlonais gaussianas um ano após o transplante. No entanto, no período D+1800 observou-se a diminuição da quantidade de famílias policlonais não gaussianas (n=6) e o aumento do número de famílias oligoclonais (n=9) e monoclonais (n=7), além do aparecimento de famílias com expressão negativa, quando comparado ao período pré-transplante (**Tabela 8**).

O paciente DM10 apresentou a redução de cinco famílias policlonais gaussianas (n=15), aumento de três famílias com expansão oligoclonal (n=4), aumento de uma família monoclonal (n=2) e redução de uma família policlonal gaussiana no período D+720 quando comparado ao pré-transplante. Além disso, o número de famílias policlonais continuou diminuindo e o de famílias oligo e monoclonais aumentando nos períodos D+1440 e D+1800 pós-TACTH, sendo que o paciente voltou a fazer uso de insulina três anos e oito meses após o transplante (entre os períodos D+1080 e D+1440) (**Tabela 8**).

O paciente DM11 apresentou uma pequena redução do número de famílias policlonais não gaussianas durante os dois primeiros anos após o transplante quando comparado ao pré-transplante. Nos períodos mais tardios após o transplante (D+1080 e D+1800) o número de famílias com distribuição policlonal não gaussiana foi diminuindo progressivamente e o número de famílias em expansão oligoclonal e monoclonal foi aumentando, assim como o número de famílias sem expressão (**Tabela 8**). Esse paciente retomou o uso de insulina somente seis anos após o transplante.

Como pode ser visto na **Tabela 8**, o paciente DM12 praticamente manteve o mesmo número de famílias policlonais gaussianas e não gaussianas, de famílias oligoclonais e monoclonais até 720 dias pós-transplante quando comparado ao pré-transplante. No período D+1080, o número de famílias policlonais não gaussianas diminuiu, porém o número de famílias policlonais gaussianas aumentou quando comparado aos períodos pré-transplante, D+360 e D+720. Além disso, no D+1080 surgiram cinco famílias em expansão oligoclonal. No período D+1800 após o transplante, o número de famílias policlonais gaussianas e não gaussianas diminuiu quando comparado ao pré-transplante e aos períodos pós-transplante (D+360, D+720 e D+1080), enquanto a quantidade de famílias em expansão oligoclonal e monoclonal e famílias negativas aumentou (**Tabela 8**). O paciente DM12 ficou transitoriamente livre do uso de insulina por vários períodos pós-transplante, entretanto retomou o uso de forma definitiva seis anos e quatro meses após o transplante.

No paciente DM13, houve redução do número de famílias policlonais não gaussianas nos dias 360 e 720 pós-transplante, enquanto que no D+720 houve o reaparecimento de uma família policlonal gaussiana (n=1). Nos períodos D+1440 e D+1800, o número de famílias policlonais gaussianas e não gaussianas diminuiu e o de famílias em expansão oligoclonal e negativas aumentou (**Tabela 8**). O paciente retomou o uso de insulina após o período D+1800.

No paciente DM14, o padrão de distribuição das famílias Vβ nos períodos D+360 e D+1080 mostrou-se igual ao do pré-transplante. Houve um aumento do número de famílias oligoclonais somente no D+1440 e de famílias monoclonais no D+1800 (**Tabela 8**). Esse paciente ficou transitoriamente livre do uso de insulina por vários períodos pós-transplante, entretanto retomou o uso de forma definitiva seis anos após o transplante.

O paciente DM15 apresentou, no período D+720 pós-transplante, o aumento da quantidade de famílias policlonais gaussianas e não gaussianas e famílias oligoclonais e a redução do número de famílias monoclonais e de famílias com expressão negativa, quando comparado ao período pré-transplante. Nos dias 1080 e 1800 pós-transplante, o número de famílias policlonais não gaussianas diminuiu e o de famílias oligoclonais, monoclonais e negativas aumentou (**Tabela 8**). O paciente DM15 retomou o uso de insulina seis anos após o TACTH.

No paciente DM16, o qual se manteve livre do uso de insulina por todo o seguimento pós-transplante avaliado, o número de famílias policlonais gaussianas e não

gaussianas manteve-se igual ao pré-transplante no período D+360. Porém, dois anos após o transplante, o número de famílias oligoclonais diminuiu e o de famílias monoclonais e negativas aumentou em relação ao pré-transplante. Nos períodos D+1440 e D+1800, o número de famílias oligoclonais e monoclonais aumentou nesse paciente (**Tabela 9**).

Os pacientes DM17 e DM18 não tiveram quantidades suficientes de PBMCs isoladas de amostras de sangue periférico coletadas no período pré-transplante, portanto a análise do repertório de célula T não foi feita nesse período nesses pacientes. Contudo, vale ressaltar que o paciente DM17, o qual se manteve livre do uso de insulina por todo o seguimento pós-transplante avaliado, apresentou várias famílias com distribuição policlonal gaussiana em praticamente todos os períodos pós-transplante (exceto no D+1080). Além disso, o número de famílias com distribuição policlonal não gaussiana estava aumentado em todos os períodos pós-transplante, porém apresentou pequena redução nos períodos D+1440 e D+1800, acompanhada do aumento de famílias com distribuição oligoclonal e monoclonal (**Tabela 9**).

No paciente DM18, foi observado o aumento das famílias com distribuição policlonal gaussiana 720 dias após o transplante quando comparado ao período D+360. Porém, nos períodos D+1440 e D+1800, o número de famílias com distribuição policlonal não gaussiana diminuiu e o de famílias oligoclonal e monoclonal aumentou quando comparado ao D+720 (**Tabela 9**). O paciente DM18 voltou a usar insulina no período D+1800.

5.3.3.3 Grupo de pacientes que não responderam ao transplante

Conforme demonstrado na **Tabela 7**, no período D+720, o paciente DM7 apresentou aumento da quantidade de famílias com distribuição policlonal não gaussiana, redução das famílias em expansão oligoclonal e o aparecimento de uma família com distribuição policlonal gaussiana. No D+1080 pós-transplante, o número de famílias policlonais aumentou e não se observou nenhuma família com distribuição oligoclonal.

No paciente DM20 houve a redução do número de famílias policlonais não gaussianas e aumento das oligoclonais, monoclonais e negativas no período D+540 quando comparado ao pré-transplante. Porém, no período D+900 o número de famílias policlonais aumentou e o de famílias oligoclonais diminuiu (**Tabela 9**).

O paciente DM23 apresentou grande redução do número de famílias policlonais não gaussianas e aumento das famílias oligoclonais e monoclonais no período D+720 (**Tabela 9**).

Tabela 7. Análise da diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH.

Número/ Paciente		Período	Famílias padrão não-gaussiano (Nº de famílias)				Nº de famílias negativas	Famílias padrão gaussiano (Nº de famílias)	Padrão de reconstituição (Nº de famílias)				CS
			Poli	Oligo	Mono	Total			I	II	III	IV	
DM1	**CTO**	**Pré**	15	1	3	**19**	2	**3**					143
		D+360	14	5	3	**22**	2	**-**	5	11	2	6	114
		D+720	14	2	2	**18**	3	**3**	5	11	1	7	130
		D+1080	8	9	5	**22**	2	**-**	5	6	2	11	86
DM2	**FCC**	**Pré**	12	7	3	**22**	2	**-**					106
		D+720	20	2	2	**24**	-	**-**	9	12	2	1	151
		D+1080	18	4	1	**23**	1	**-**	8	12	2	2	142
		D+1800	10	10	3	**23**	1	**-**	3	7	9	5	100
DM3	**VTR**	**Pré**	21	-	3	**24**	-	**-**					165
		D+360	13	6	2	**21**	3	**-**	1	12	1	10	111
		D+720	19	-	1	**20**	-	**4**	2	21	1	-	180
DM4	**TAS**	**Pré**	20	1	1	**22**	-	**2**					180
		D+360	17	4	2	**23**	1	**-**	-	17	2	5	135
		D+720	23	-	1	**24**	-	**-**	1	22	1	-	183
		D+1440	11	5	5	**21**	2	**1**	1	11	1	11	108
		D+1800	12	4	5	**21**	3	**-**	1	11	1	11	105
DM5	**GBA**	**Pré**	19	1	1	**21**	-	**3**					179
		D+360	17	4	2	**23**	1	**-**	-	17	2	5	128
		D+720	17	4	1	**22**	2	**-**	-	17	2	5	142
		D+1080	22	1	1	**24**	-	**-**	-	22	2	-	172
		D+1440	20	3	1	**24**	-	**-**	-	20	2	2	160
DM6	**LTF**	**Pré**	21	1	1	**23**	-	**1**					166
		D+360	21	-	1	**22**	-	**2**	1	22	1	-	182
		D+720	18	3	1	**22**	2	**-**	-	17	1	6	141
		D+1440	8	6	9	**23**	1	**-**	-	8	1	15	70
		D+1800	11	8	4	**23**	1	**-**	-	11	2	11	109
DM7	**MTM**	**Pré**	17	5	1	**23**	-	**1**					152
		D+360	10	8	4	**22**	2	**-**	1	9	5	9	97
		D+720	19	3	1	**23**	-	**1**	4	16	2	2	149
		D+1080	22	-	1	**23**	1	**-**	5	17	1	1	168
DM8	**PMR**	**Pré**	16	1	1	**18**	-	**6**					177
		D+360	22	-	-	**22**	-	**2**	2	22	-	-	189
		D+720	20	1	1	**22**	-	**2**	1	21	1	1	181
		D+1080	13	4	5	**22**	2	**-**	-	13	1	10	110
		D+1440	14	7	2	**23**	1	**-**	2	13	9	-	126
		D+1800	13	3	6	**22**	2	**-**	13	-	2	9	103

O repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisado método de *TCRBV spectratyping*. A diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada com base no "*complexity score*" e no número total de picos. Poli, famílias Vβ policlonais não-gaussianas; Oligo, famílias Vβ oligoclonais; Mono, famílias Vβ monoclonais; CS, "*Complexity Score*"; Pré, pré-transplante; TCR,Receptor de células.

Tabela 8. Análise da diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH.

Número/ Paciente		Período	Famílias padrão não-gaussiano (Nº de famílias)				Nº de famílias negativas	Famílias padrão gaussiano (Nº de famílias)	Padrão de reconstituição (Nº de famílias)				CS
			Poli	Oligo	Mono	Total			I	II	III	IV	
DM9	**WSL**	**Pré**	22	2	-	**24**	-	**-**					180
		D+360	19	2	-	**21**	1	**2**	1	20	1	2	151
		D+1800	6	9	7	**22**	2	**-**	-	6	2	16	76
DM10	**RAOA**	**Pré**	20	1	1	**22**	-	**2**					175
		D+360	12	2	7	**21**	2	**1**	-	13	2	9	107
		D+720	15	4	2	**21**	2	**1**	1	15	1	7	127
		D+1440	11	3	6	**20**	4	**-**	-	11	2	11	98
		D+1800	8	4	9	**21**	2	**1**	-	9	2	13	86
DM11	**RRS**	**Pré**	22	-	1	**23**	-	**1**					183
		D+360	20	1	-	**21**	-	**3**	-	23	1	-	182
		D+720	20	3	1	**24**	-	**-**	-	20	1	3	160
		D+1080	9	11	3	**23**	1	**-**	-	9	1	14	90
		D+1800	7	9	5	**21**	3	**-**	-	7	1	16	74
DM12	**ALSR**	**Pré**	21	-	1	**22**	1	**1**					153
		D+360	22	-	1	**23**	-	**1**	-	18	2	4	150
		D+720	22	-	1	**23**	-	**1**	1	22	1	-	169
		D+1080	15	5	1	**21**	-	**3**	1	16	1	6	141
		D+1800	10	7	4	**21**	2	**1**	-	11	2	11	107
DM13	**JFA**	**Pré**	20	1	2	**23**	-	**1**					160
		D+360	19	1	2	**22**	2	**-**	2	17	1	4	151
		D+720	18	3	1	**22**	1	**1**	2	17	2	3	157
		D+1080	15	8	1	**24**	-	**-**	2	14	2	6	130
		D+1440	13	4	3	**20**	4	**-**	1	12	2	9	107
DM14	**MGB**	**Pré**	21	-	1	**22**	1	**1**					169
		D+360	22	-	2	**23**	1	**-**	-	22	2	-	170
		D+1080	19	2	1	**22**	2	**-**	-	19	2	3	138
		D+1440	13	8	1	**22**	2	**-**	-	17	2	5	120
		D+1800	17	2	4	**23**	1	**-**	-	17	2	5	130
DM15	**ISJ**	**Pré**	13	2	5	**20**	4	**-**					107
		D+360	23	-	-	**23**	-	**1**	11	12	1	-	169
		D+720	15	6	2	**23**	-	**1**	5	11	7	1	142
		D+1080	9	5	3	**17**	5	**2**	2	8	8	6	88
		D+1800	9	10	3	**22**	2	**-**	-	9	10	5	98

O repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisado método de *TCRBV spectratyping*. A diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada com base no "*complexity score*" e no número total de picos. Poli, famílias Vβ policlonais não-gaussianas; Oligo, famílias Vβ oligoclonais; Mono, famílias Vβ monoclonais; CS, "*Complexity Score*"; Pré, pré-transplante; TCR,Receptor de células

Tabela 9. Análise da diversidade e clonalidade do repertório Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 pré e sequencialmente após o TACTH.

Número/ Paciente		Período	Famílias padrão não-gaussiano (Nº de famílias)				Nº de famílias negativas	Famílias padrão gaussiano (Nº de famílias)	Padrão de reconstituição (Nº de famílias)				CS
			Poli	Oligo	Mono	Total			I	II	III	IV	
DM16	**HFG**	**Pré**	16	2	1	**19**	-	**5**					169
		D+360	17	-	1	**18**	1	**5**	2	20	1	1	173
		D+720	15	4	2	**21**	3	**-**	1	14	2	7	123
		D+1440	13	3	3	**19**	3	**2**	1	12	2	9	120
		D+1800	13	9	1	**23**	1	**-**	1	12	2	9	123
DM17	**RLFS**	**Pré**											
		D+360	20	2	1	**23**	-	**1**					170
		D+720	20	-	1	**21**	1	**2**					169
		D+1080	21	2	1	**24**	-	**-**					164
		D+1440	17	4	1	**22**	-	**2**					146
		D+1800	12	5	5	**22**	1	**1**					108
DM18	**CPS**	**Pré**											
		D+360	14	5	2	**21**	3	**-**					114
		D+720	20	-	1	**21**	2	**1**					159
		D+1440	11	6	5	**22**	2	**-**					92
		D+1800	15	2	5	**22**	1	**1**					130
DM19	**TDP**	**Pré**	17	4	1	**22**	2	**-**					124
		D+360	17	5	2	**24**	-	**-**	4	14	3	3	142
		D+720	12	7	3	**22**	1	**1**	2	12	5	5	116
DM20	**MQS**	**Pré**	9	9	5	**23**	1	**-**					91
		D+540	5	8	6	**19**	5	**-**	1	4	14	5	66
		D+900	10	4	6	**20**	4	**-**	4	5	12	3	79
DM21	**TKF**	**Pré**	20	-	1	**21**	1	**2**					167
		D+360	17	2	3	**22**	1	**1**	-	18	2	4	140
		D+720	14	5	3	**22**	2	**-**	-	14	2	8	114
		D+1080	13	5	4	**22**	-	**2**	1	14	1	8	131
		D+1440	18	3	1	**22**	-	**2**	1	19	1	3	154
DM22	**MSG**	**Pré**	17	3	1	**21**	3	**-**					155
		D+1440	17	4	2	**23**	1	**-**	-	17	4	3	127
DM23	**ECP**	**Pré**	10	7	4	**21**	3	**-**					95
		D+720	4	11	7	**22**	2	**-**	6	4	14	-	63

O repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisado método de *TCRBV spectratyping*. A diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada com base no "*complexity score*" e no número total de picos. Poli, famílias Vβ policlonais não-gaussianas; Oligo, famílias Vβ oligoclonais; Mono, famílias Vβ monoclonais; CS, "*Complexity Score*"; Pré, pré-transplante; TCR,Receptor de células

5.3.4 Padrões de reconstituição das famílias Vβ após TACTH

O padrão de reconstituição das famílias Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1 foi analisado nos períodos D+360, D+720, D+1080, D+1440 e D+1800 após o TACTH (**Tabela 7-9**). Como citado anteriormente, existem quatro padrões básicos de reconstituição do repertório da célula T: o padrão I consiste na recuperação da diversidade a partir de um repertório pré-transplante restrito, o padrão II que consiste na reconstituição da diversidade a partir de um repertório pré-transplante diverso, o padrão III consiste no reaparecimento total ou parcial de um repertório pré-transplante restrito e o padrão IV consiste na reconstituição de um repertório restrito a partir de um repertório pré-transplante diverso.

Nas **Figuras 9-10** podem ser observados exemplos dos padrões de reconstituição das famílias Vβ dos TCRs dos pacientes com DM-1. A família Vβ8 do paciente DM2 apresentou o padrão I de reconstituição no período D+720, enquanto a família Vβ13 deste mesmo paciente e neste mesmo período reconstitui-se conforme o padrão II. As famílias Vβ19 dos dois pacientes apresentaram o padrão III de reconstituição no período D+720 (e em praticamente em todos os períodos pós-transplante), e a família Vβ1 do paciente DM8 reconstitui-se conforme o padrão IV no período D+1800.

O padrão II de reconstituição das famílias Vβ, no qual ocorre a reconstituição da diversidade a partir de um repertório pré-transplante diverso, foi predominante nos pacientes com DM-1 de ambos os grupos, os que ficaram livres de insulina por período maior ou igual a três anos pós-transplante e os ficaram livres de insulina por período menor que três anos pós-transplante, em todos os períodos pós-transplante (D+360, D+720, D+1080, D+1440 e D+1800) (**Tabelas 7-9**).

Porém, é importante ressaltar que houve aumento da ocorrência do padrão de reconstituição IV, em que se observa a reconstituição de um repertório restrito a partir de um repertório pré-transplante diverso, no período D+1800 em relação aos outros períodos D+360, D+720, D+1080 e D+1440, indicando uma redução da diversidade e restrição do repertório do TCR em períodos mais tardios após o TACTH.

No período D+360, o padrão de reconstituição mais comum em todos os pacientes analisados foi o padrão II (DM1, DM3, DM4, DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM10, DM11, DM12, DM13, DM14, DM15, DM16, DM19, DM21) (**Tabelas 7-9**).

No período D+720, apenas um paciente (DM23) apresentou o padrão III como o padrão mais comum de reconstituição, enquanto em todos os outros pacientes (DM1, DM2, DM3, DM4, DM5, DM6, DM7, DM8, DM10, DM11, DM12, DM13, DM15, DM16, DM19, DM21) analisados nesse mesmo período, o padrão II foi o padrão de reconstituição predominante (**Tabelas 7-9**).

No período D+1080, apenas dois pacientes (DM1 e DM11) apresentaram principalmente o padrão de reconstituição IV e oito pacientes apresentaram o padrão II (DM5, DM8, DM12, DM13, DM14, DM15, DM16, DM21). No paciente DM7, os padrões de reconstituição II e IV foram os mais predominantes no período D+1080 (**Tabela 7**).

No período D+1440 pós-transplante, sete pacientes mostraram predominantemente o padrão II de reconstituição (DM5, DM8, DM13, DM14, DM16, DM21 e DM22) e dois pacientes (DM4 e DM10) apresentaram principalmente os padrões de reconstituição II e IV. As famílias Vβ do paciente DM6 reconstituiram-se predominantemente conforme o padrão IV (**Tabela 7**).

No último período D+1800, os pacientes DM14 e DM16 apresentaram principalmente o padrão de reconstituição II, enquanto os pacientes DM4, DM6 e DM10 apresentaram predominantemente os padrões II e IV. Os pacientes DM9, DM10 e DM11 apresentaram predominantemente o padrão de reconstituição IV (**Tabelas 7-9**).

A família Vβ19 reconstitui-se predominantemente conforme o padrão III e apresentou-se em expansão monoclonal na grande maioria dos pacientes analisados antes do transplante e em todos os períodos pós-transplante (**Figuras B.1-B.23**). Os segmentos de CDR3 de tamanho de 13aa e 14aa foram os mais frequentes nessa família.

5.3.5 Frequências das famílias Vβ nos pacientes com DM-1 submetidos ao TACTH

As frequências relativas das 24 famílias Vβ foram avaliadas nos indivíduos do grupo controle e nos pacientes com DM-1 antes e sequencialmente após o TACTH (**Figuras 12-24**; **Tabelas A.1-A.24**).

Foram comparadas as frequências relativas das famílias Vβ nos indivíduos do grupo controle com os pacientes com DM-1 no período pré-transplante e as frequências relativas das famílias Vβ nos pacientes com DM-1 no período pré-transplante com os

períodos D+180, D+360, D+720, D+1080, D+1440 e D+1800 pós-transplante (**Figuras 12-18**).

Na **Figura 12** estão representadas as frequências relativas das famílias Vβ nos indivíduos sadios e nos pacientes com DM-1 antes do transplante. As frequências das famílias Vβ 7, 18, 19 e 20 foram significativamente aumentadas (p<0,05) nos pacientes com DM-1 recém-diagnosticado quando comparado ao grupo controle.

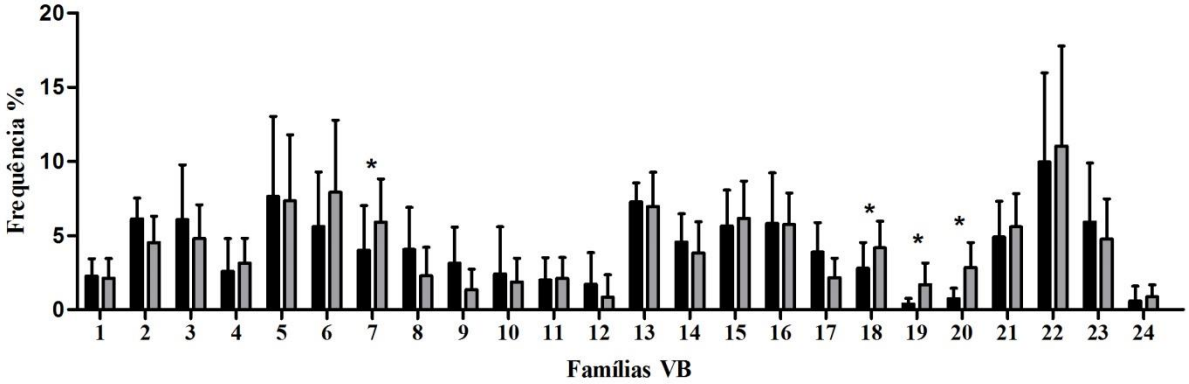


Figura 12. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 antes do TACTH. As barras em preto representam o grupo controle e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) p < 0,05

Quando comparado o período pré-transplante com o período D+180, não foram encontradas diferenças estatísticas entre as frequências das famílias (**Figura 13**). Contudo, no período D+360, foi observada uma diminuição da frequência da família Vβ 17 e um aumento da frequência da família Vβ 20 quando comparado ao pré-transplante (**Figura 14**).

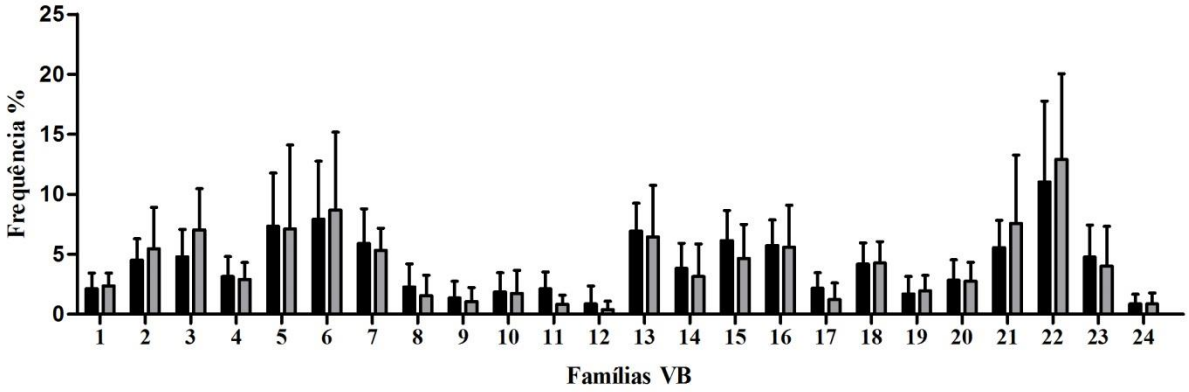


Figura 13. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+180 pós-TACTH. As barras em preto representam os pacientes com DM-1 no pré-TACTH e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+180. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

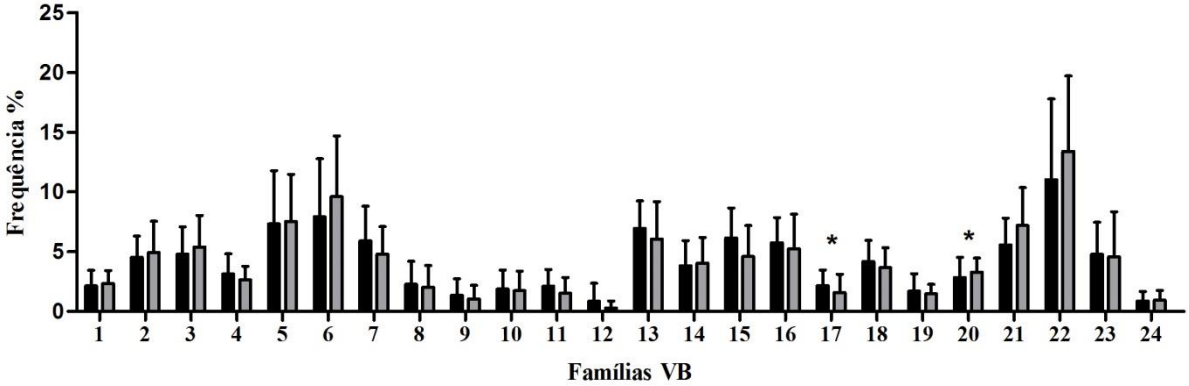


Figura 14. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+360 pós-TACTH. As barras em preto representam os pacientes com DM-1 no pré-TACTH e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+360. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

No período D+720, as famílias Vβ 11 e 13 apresentaram redução da frequência quando comparado ao pré-transplante ($p<0,05$) (**Figura 15**). Já 1080 dias após o transplante, houve redução significativa da frequência das famílias Vβ 9, 11, 15, 16 e 23 e aumento da frequência das famílias Vβ19 e 22 em relação ao pré-transplante (**Figura 16**).

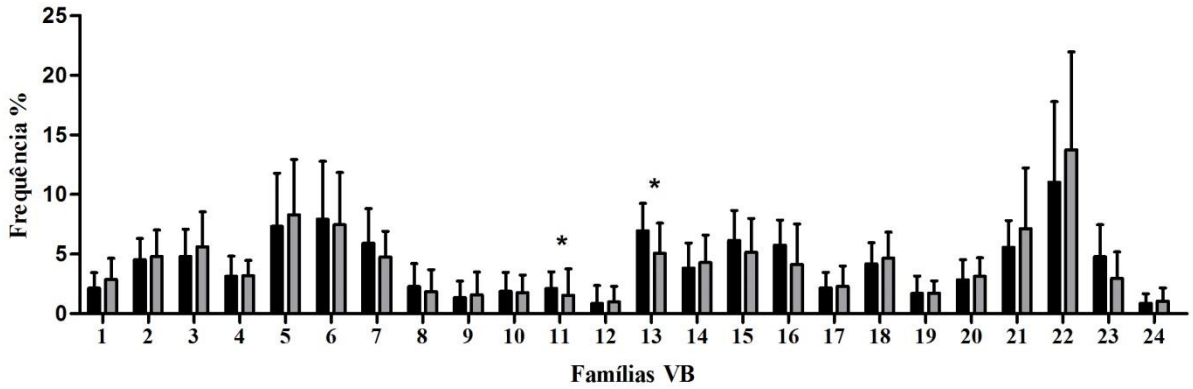


Figura 15. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+720 pós-TACTH. As barras em preto representam os pacientes com DM-1 no pré-TACTH e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+720. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

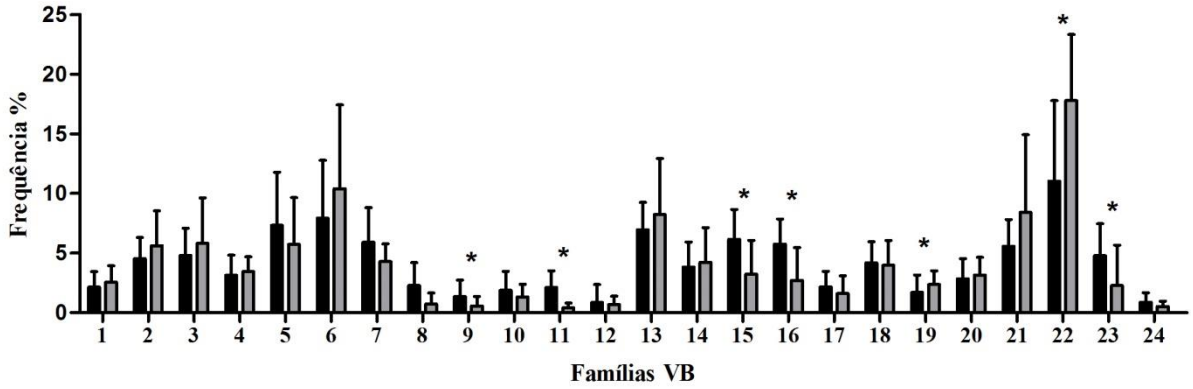


Figura 16. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+1080 pós-TACTH. As barras em preto representam os pacientes com DM-1 no pré-TACTH e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+1080. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

Foram observados a redução significativa das frequências das famílias Vβ 5, 9, 10 e 17 e o aumento das frequências das famílias Vβ 4, 19, 20 e 22 ($p<0,05$) no período D+1440 em relação ao pré-transplante (**Figura 17**). Já no período D+1800, houve redução da frequência das famílias Vβ 9, 11, 15, 16, 17 e 23 e aumento da frequência das famílias Vβ 19 e 22 ($P<0,05$) (**Figura 18**).

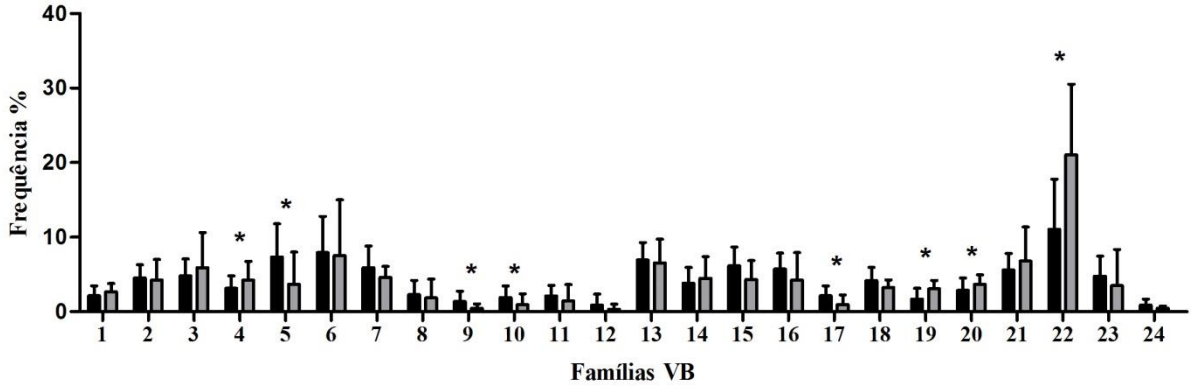


Figura 17. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+1440 pós-TACTH. As barras em preto representam os pacientes com DM-1 no pré-TACTH e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+1440. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

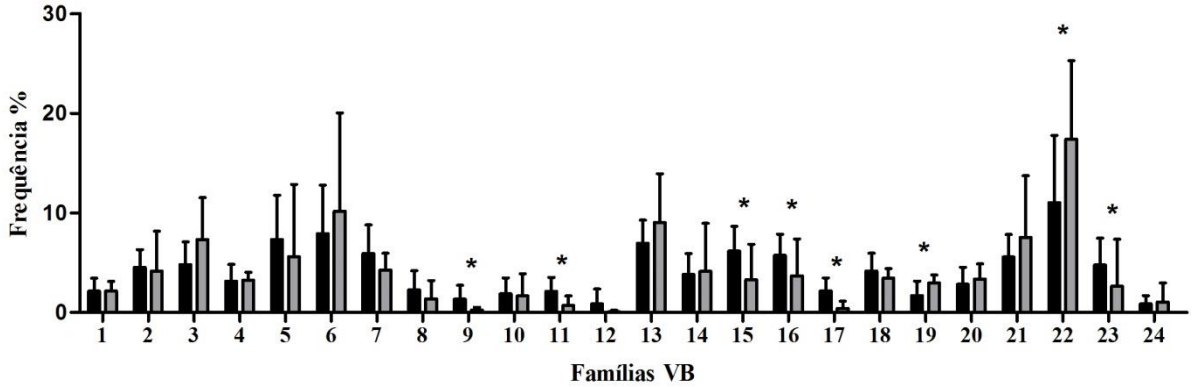


Figura 18. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T nos pacientes com DM-1 antes do TACTH e no período D+1800 pós-TACTH. As barras em preto representam os pacientes com DM-1 no pré-TACTH e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+1800. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

Além disso, foram comparadas as frequências relativas das famílias Vβ nos indivíduos sadios do grupo controle com os pacientes com DM-1 nos períodos D+180, D+360, D+720, D+1080, D+1440 e D+1800 pós-transplante (**Figuras 19-24**).

Como pode ser observado na **Figura 19**, as frequências das famílias Vβ 9 e 17 nos pacientes com DM-1 no período D+180 foram significativamente menores que as

frequências dessas mesmas famílias no grupo de indivíduos sadios, enquanto as frequências das famílias Vβ 7, 18, 19 e 20 foram significativamente maiores.

No período D+360, as frequências das famílias Vβ 9 e 17 estavam significativamente diminuídas quando comparadas ao grupo controle e as frequências das famílias Vβ 7, 18, 19, 20 e 24 estavam aumentadas (p<0,05) (**Figura 20**).

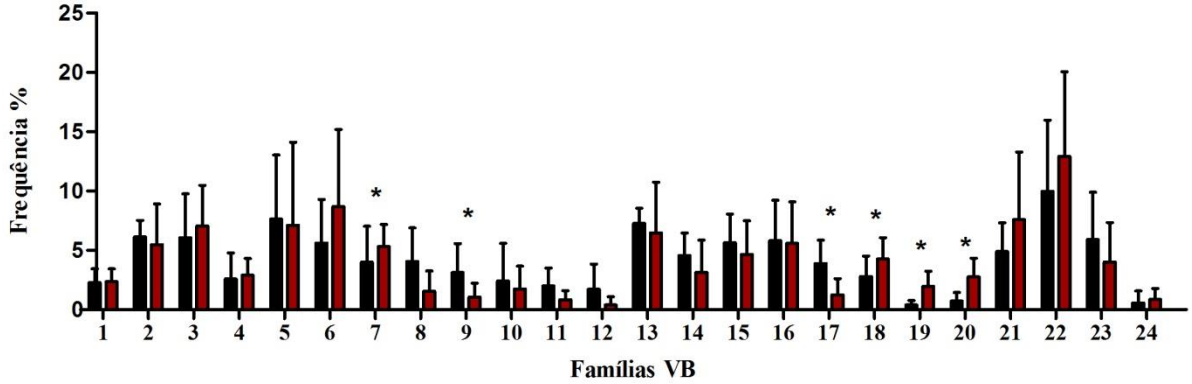


Figura 19. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+180 pós-TACTH. As barras em preto representam grupo controle e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+180. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) p < 0,05

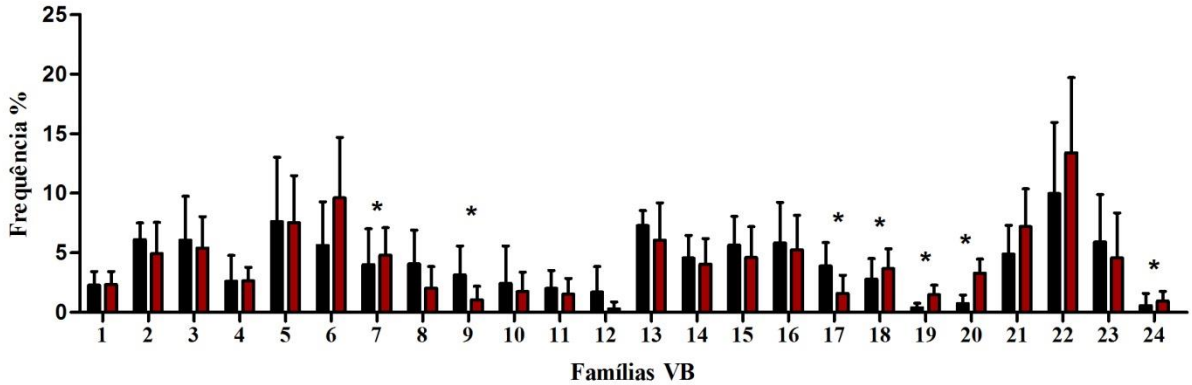


Figura 20. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+360 pós-TACTH. As barras em preto representam grupo controle e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+360. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) p < 0,05

Aos dois anos após o transplante, foi observado que as frequências das famílias Vβ 7, 18, 19 e 20 foram significantemente maiores que as frequências dessas famílias

no grupo controle, enquanto no período D+1080, além da frequência aumentada das famílias Vβ 18, 19, 20, também houve aumento significantivo das frequências das famílias Vβ 4 e 22 quando comparado aos indivíduos sadios (**Figura 21** e **22**). Além disso, no período D+1080, as frequências das famílias Vβ 9, 11, 16 e 23 estavam significativamente diminuídas em relação ao grupo controle (**Figura 22**).

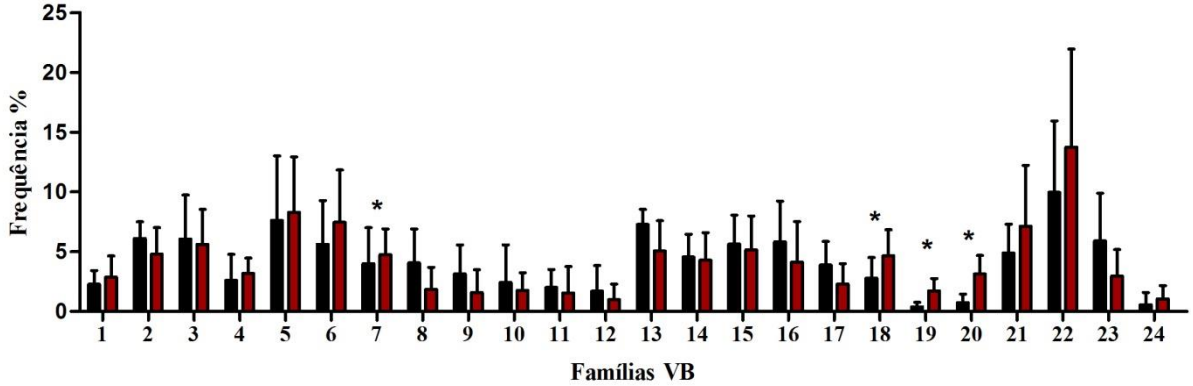


Figura 21. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+720 pós-TACTH. As barras em preto representam grupo controle e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+720. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

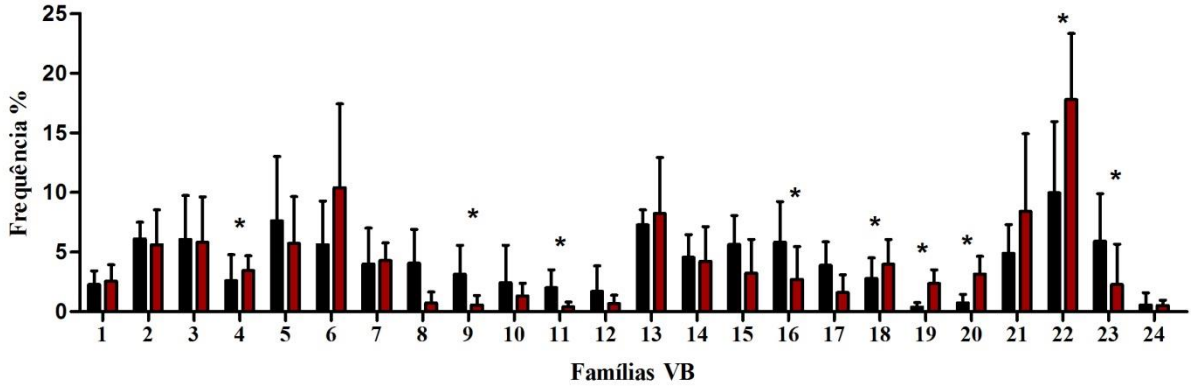


Figura 22. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+1080 pós-TACTH. As barras em preto representam grupo controle e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+1080. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

No período D+1440, as famílias Vβ 9 e 17 apresentaram frequências significativamente menores (p<0,05) e as famílias Vβ 4, 19, 20 e 22 frequências significativamente maiores quando comparadas ao indivíduos sadios (**Figura 23**). Já no período D+1800, as frequências das famílias Vβ 2, 9, 11, 17 e 23 estavam significativamente diminuídas em relação às frequências no grupo controle, enquanto as famílias Vβ 4, 18, 19 e 20 estavam significativamente aumentadas (**Figura 24**).

De modo geral, os resultados demonstraram que cinco famílias Vβ (7, 18, 19, 20 e 22) estavam em expansão clonal nos pacientes com DM-1. As famílias Vβ 7, 18, 19, 20 apresentaram-se em expansão clonal antes do transplante e se mantiveram com frequência elevada após o transplante, enquanto a família Vβ 22 apresentou aumento da frequência somente nos períodos mais tardios após o transplante. Interessantemente, a família Vβ 19 apresentou distribuição monoclonal dos picos de CDR3 do TCR em praticamente todos pacientes com DM-1 antes e nos seguimentos pós-transplante. As famílias Vβ 7 e 22 apresentaram predominantemente a distribuição policlonal dos segmentos de CDR3 do TCR antes e após o transplante, enquanto as famílias Vβ 18 e 20 apresentaram a distribuição mais restrita (oligoclonal) dos segmentos de CDR3 do TCR no período pré-transplante e, principalmente, nos períodos mais tardios pós-transplante (**Figuras B.1-B.23**).

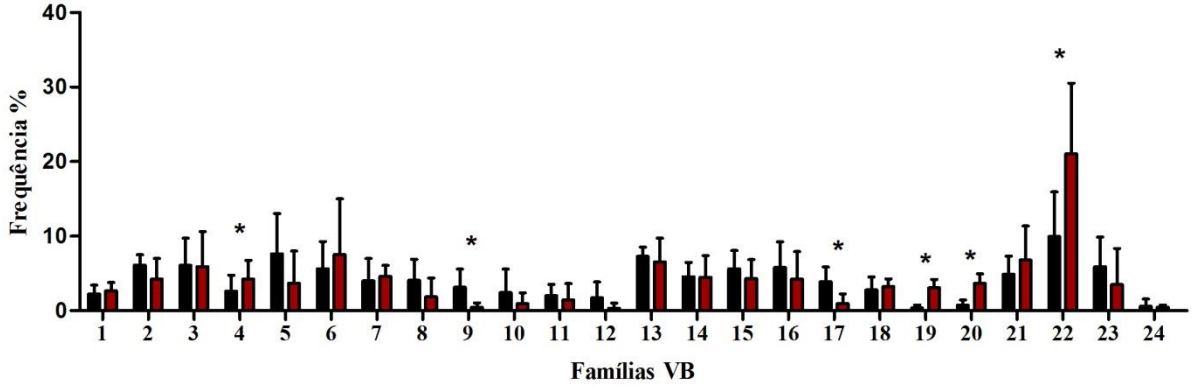


Figura 23. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+1440 pós-TACTH. As barras em preto representam grupo controle e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+1440 As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) p < 0,05

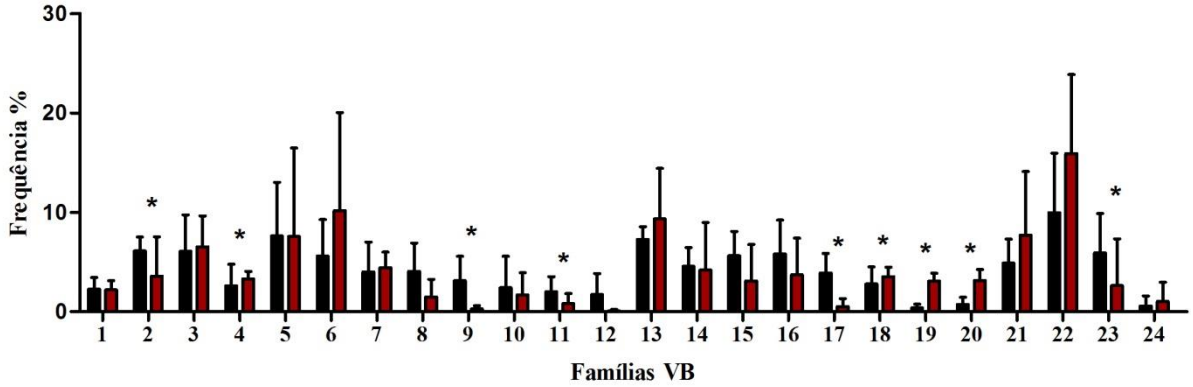


Figura 24. Frequência das 24 famílias Vβ do receptor de células T no grupo controle e nos pacientes com DM-1 no período D+1800 pós-TACTH. As barras em preto representam grupo controle e as barras em cinza representam os pacientes com DM-1 no período D+1800. As frequências relativas das famílias (em %) estão representadas pela média e desvio padrão dos valores. (*) $p < 0,05$

5.4 Correlação entre os níveis de TRECs, a complexidade do repertório de células T e os níveis de peptídeo-C de pacientes com DM-1

Com o objetivo de avaliar se houve correlação entre os níveis de TRECs, a complexidade do repertório de células T (*complexity score*) e os níveis séricos de peptídeo-C nos pacientes com DM-1 antes e pós-transplante, foi realizada a análise de regressão linear com efeitos mistos.

Primeiramente, foi avaliado se os níveis de TRECs no sangue periférico (variável independente) possuíam relação linear com o *complexity score* (variável resposta). Posteriormente, foi analisado se os níveis de TRECs no sangue periférico (variável independente) correlacionavam-se linearmente com os níveis séricos de peptídeo-C (variável resposta) e, por fim, foi avaliado se o *complexity score* (variável independente) possuía relação linear com níveis séricos de peptídeo-C (variável resposa).

Em nenhuma análise foi encontrada correlações, indicando que as variáveis independentes não possuem relação linear com a resposta, ou seja, os níveis de TRECs não apresentaram relação linear com *complexity score* e nem com os valores de peptídeo-C, assim como o *complexity score* não se correlacionou com os valores de peptídeo-C.

Discussão

6 Discussão

6.1 Produção tímica de células T *naive* nos pacientes com DM-1 antes e após o tratamento com IAD seguida pelo TACTH

Em nosso trabalho, a produção tímica de células T *naive* foi avaliada pela quantificação absoluta do gene TREC. Foram encontrados baixos níveis de TRECs nas células mononucleares de sangue periférico dos pacientes com DM-1 cem dias pós-transplante, provavelmente devido à intensa imunoablação a qual os pacientes foram submetidos e à intensa expansão periférica de células T característica dos primeiros meses pós-TCTH (LIP) (Williams, Hakim e Gress, 2007; Williams e Gress, 2008). Contudo, o número de moléculas de TRECs começou aumentar um ano após o TACTH, assumindo valores significativamente maiores que pré-transplante do período D+540 até o D+1800 pós-transplante.

Esses resultados indicam que houve reativação tímica (*thymic rebound*) nos pacientes com DM-1, confirmando a contribuição do timo na reconstituição imunológica após o TACTH e corroborando com estudos que demonstram que o timo tem papel fundamental na produção de células T *naive* e que, embora a atividade e o tamanho do timo diminuam com a idade, a sua atividade não é eliminada (Douek *et al.*, 2000; Talvensaari *et al.*, 2002; Hakim *et al.*, 2005; Toubert *et al.*, 2012; Clave *et al.*, 2013).

Em 2005, foi realizado um amplo estudo avaliando a reativação da função tímica em pacientes com câncer de mama tratados pelo TACTH (Hakim *et al.*, 2005). Os autores demonstraram que, após o transplante, houve aumento no tamanho do timo, sendo esse aumento inversamente proporcional à idade. Concomitantemente ao aumento do tecido tímico, foi observado o aumento da produção de células T *naive* ($CD4^+CD45RA^+CD62L^+$) e o aumento dos níveis de TRECs no sangue periférico, de modo que nos pacientes que tiveram maior aumento do timo, foi detectado maior produção de células T *naive.* Além disso, nesse mesmo estudo, foi mostrado que a maior diversidade do repertório tanto de células T *naive* e como de memória, ambos restritos até seis meses após o transplante, foi alcançada somente após o aumento da produção de células T pelo timo (Hakim *et al.*, 2005).

Em estudos com humanos, foi demonstrado que neonatos timectomizados durante cirurgias cardíacas apresentaram redução no número total de linfócitos T,

acompanhada da redução dos níveis de TREC e da restrição do repertório desses linfócitos, indicando o papel fundamental do timo no desenvolvimento da resposta imunológica de células T (Madhok *et al.*, 2005; Mancebo *et al.*, 2008).

Estudos em camundongos timectomizados mostraram que na ausência do timo a reconstituição imunológica periférica prevalece (Mackall *et al.*, 1993). No entanto, embora a expansão homeostática periférica consiga restaurar o número de células T após imunoablação maciça, o timo é a fonte exclusiva de novas especificidades de células T (Berzins *et al.*, 2002).

Em indivíduos adultos, foi mostrado que células T *naive* começaram a reaparecer somente quinze meses após a quimioterapia intensa, sendo a recuperação de células T *naive* na subpopulação de células T $CD4^+$ mais lenta que na de células T $CD8^+$, a qual correlacionou inversamente com a idade e diretamente com o aumento do timo (Mackall *et al.*, 1995; Mackall *et al.*, 1996).

Heitger *et al.* (1997) demonstraram que em pacientes com câncer submetidos ao transplante de medula óssea, as células T $CD4^+$ e $CD8^+$ *naive* reconstituem-se de maneiras diferentes, sendo as células T $CD4^+$ mais dependentes da reativação tímica. Os autores observaram uma redução significativa no número de células T $CD4^+$ *naive* nos primeiros anos pós-transplante nos pacientes que foram timectomizados e não encontraram diferenças nos números de células T $CD8^+$ *naive* nesses pacientes, quando comparados aos pacientes que não foram timectomizados (Heitger *et al.*, 1997).

Em um estudo recente, foi observado que a ATG, que é amplamente utilizada em regimes de condicionamento antes do TCTH, pode atuar como um fator que afeta a reconstituição de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ *naive* pelo timo (Na *et al.*, 2013). Segundo os autores, a reconstituição de células T $CD4^+$ recém-emigrantes do timo foi mais lenta durante os seis primeiros meses pós-transplante nos pacientes tratados com ATG quando comparado aos não tratados, enquanto as células T $CD8^+$ *naive* não tiveram a reconstituição afetada pelo uso da ATG.

Estudos mostram que existe produção extratímica de células T *naive*, porém ainda trata-se de um processo pouco entendido, no qual não se sabe o quanto esses locais contribuem para produção total de células T (Mcclory *et al.*, 2012). Embora alguns grupos de linfócitos T consigam desenvolver-se em locais como o intestino, o fígado, a medula óssea (em camundongos) e nas tonsilas (em humanos), há poucas evidências de que lugares extratímicos sejam capazes da produção diversa de TCRs em

humanos como no timo (Sato *et al.*, 1995; García-Ojeda *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 1998; Douek *et al.*, 2000; Mcclory *et al.*, 2012).

Recentemente, Holland e colaboradores (2012) demonstraram que a produção extratímica de células T em camundongos após o transplante de medula óssea foi capaz de contribuir com a produção de um *pool* diverso de células T. Contudo, pacientes com timo ausente, como na imunodeficiência severa combinada e na síndrome de DiGeorge, apresentam concentrações muito baixas de TRECs, como também o repertório de células T restrito (Pierdominici *et al.*, 2003; Somech, 2011).

Segundo Douek *et al*. (2000), existe correlação inversa entre a idade e os níveis de TRECs no sangue periférico, o que é esperado devido diminuição do tecido tímico com a idade. Contudo, a concentração de TRECs no sangue periférico não é influenciada somente pela produção tímica (Douek *et al.*, 1998). Os valores de TRECs também podem ser influenciados pela divisão periférica das células T, sendo que o aumento das divisões celulares leva a uma queda nos números de TRECs presentes no sangue periférico, e por diferenças sexuais, já que foi observado que mulheres possuem maior quantidade de moléculas de TRECs no sangue periférico do que homens (Pido-Lopez, Imami e Aspinall, 2001; Farge *et al.*, 2005; Kurosaka *et al.*, 2007; Somech, 2011; Den Braber *et al.*, 2012; Zhang e Bhandoola, 2012).

Estudos em pacientes com diferentes doenças autoimunes e outras doenças imunológicas e/ou hematológicas submetidos ao TCTH (alogênico ou autólogo) indicam que a reconstituição de um repertório novo e diverso de células T é decorrente, sobretudo, da reativação da função tímica após o transplante (Hazenberg *et al.*, 2002; Toubert *et al.*, 2012; Azevedo *et al.*, 2013; Clave *et al.*, 2013).

Em pacientes com esclerose múltipla submetidos ao TACTH, foi visto que o número de moléculas de TRECs estava diminuído seis meses após o transplante, aumentando para valores próximos aos normais aos doze meses pós-transplante (Sun *et al.*, 2004). Em pacientes com esclerose sistêmica, também foi demonstrado que os valores de TRECs diminuíram logo após o transplante, apresentando aumento significativo entre 10-12 meses pós-TACTH (Farge *et al.*, 2005). Storek e colcaboradores (2008) demonstraram que em pacientes com esclerose múltipla e esclerose sistêmica os números de TRECs foram indetectáveis após um mês do TACTH, assumindo valores significativos somente após três meses do transplante.

Muraro e colaboradores (2005) mostraram pela primeira vez que a remissão clínica observada em pacientes com esclerose múltipla após o TACTH não foi

decorrente somente da linfopenia resultante da imunossupressão que esses pacientes receberam, mas de mudanças qualitativas profundas no sistema imunológico que demonstram a renovação do compartimento de células T nesses pacientes. Os autores demonstraram que, dois anos após o TACTH, a frequência de células T recém-emigrantes do timo dobrou em relação ao período pré-transplante. Concomitantemente, o número de TRECs aumentou 7,9 vezes um ano após o transplante e 5,4 vezes dois anos após o transplante. Os autores também mostraram que o aumento dos valores de TRECs após o TACTH estava associado, sobretudo, ao aumento do repertório das células T $CD4^+$ *naive* (Muraro *et al.*, 2005).

Alexander *et al*. (2009) demonstraram que a produção de células T pelo timo foi muito importante na reconstituição de células T em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico após o TACTH. Os autores demonstraram o aumento significativo de células T $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ recém-emigrantes do timo seis meses após o transplante, atingindo valores maiores que no período pré-transplante e que no grupo de indivíduos sadios.

Portanto, nossos resultados corroboram trabalhos da literatura que mostraram que o TACTH foi capaz de aumentar a timopoiese em pacientes com outras DAIs (esclerose múltipla, esclerose sistêmica e lúpus eritematoso sistêmico) (Sun *et al.*, 2004; Farge *et al.*, 2005; Muraro *et al.*, 2005; Alexander *et al.*, 2009). Desse modo, sugerimos que a reativação tímica após o TACTH seja um mecanismo comum que contribui para a renovação do repertório de células T e consequentemente para o restabelecimento da tolerância imunológica em pacientes com diferentes DAIs.

Contudo, os fatores que contribuem para a reativação tímica após o TCTH não estão completamente elucidados. Alguns estudos demonstram que o aumento da produção de IL-7, característico dos primeiros meses pós-transplante (durante a fase de LIP, conforme citado anteriormente), poderia contribuir não só para a expansão periférica de células T, mas também para o aumento da função tímica (Bolotin *et al.*, 1996; Alpdogan *et al.*, 2001; Hakim *et al.*, 2005; Williams e Gress, 2008). Em estudo com camundongos, foi demonstrado que a administração de IL-7 logo após transplante de medula óssea, contribuiu para o aumento da produção de células T pelo timo (Bolotin *et al.*, 1996; Alpdogan *et al.*, 2001; Mackall *et al.*, 2001).

Recentemente, em um estudo clinico de fase I/IIa com pacientes infectados com vírus do HIV, foi mostrado que a administração de IL-7 recombinante após o tratamento com a terapia antirretroviral aumentou a número de células T *naive*, células T recém-

emigrantes do timo ($CD4^+CD45RA^+CD31^+$) e de memória central nesses pacientes. Além disso, houve aumento nos níveis de TRECs e na diversidade do repertório das células T nesses pacientes após a administração de IL-7 (Lévy *et al.*, 2012).

6.2 Diversidade do repertório de células T nos pacientes com DM-1 antes e após o tratamento com IAD seguida pelo TACTH

Em nosso trabalho, análises da distribuição dos picos de CDR3 do TCR revelaram que as famílias Vβ com distribuição policlonal (gaussiana ou não) predominaram no período pré-transplante nos pacientes com DM-1. Além disso, durante os dois primeiros anos pós-transplante, essas famílias com distribuição policlonal foram as mais comuns na maioria dos pacientes com DM-1 tanto no grupo DM-1<3anos como no grupo DM-1≥3anos. Entretanto, o número de famílias Vβ com distribuição oligoclonal e monoclonal aumentou nos períodos mais tardios após o transplante (três, quatro e cinco anos após), nos quais a maioria dos pacientes já havia retomado o uso de insulina por períodos de tempo variáveis.

Além disso, também não foram observadas diferenças estatísticas entre o CS (*complexity score*) dos pacientes antes do transplante e o grupo de indivíduos sadios, demonstrando também uma ampla diversidade do repertório de células T nos pacientes diabéticos recém-diagnosticados, no qual há predomínio da distribuição gaussiana dos picos de CDR3 do TCR. Contudo, nos períodos mais tardios após o transplante (D+900-D+1800), houve redução do CS quando comparado ao pré-transplante (tanto no grupo DM-1<3anos como no grupo DM-1≥3anos).

Esses resultados corroboram dados da literatura que indicam que pacientes recém-diagnosticados para o DM-1, ao contrário de outras DAIs, apresentam o repertório de células T diverso, porém com a progressão da doença, o repertório torna-se mais restrito (Drexler, Burtles e Hurtenbach, 1993; Galley e Danska, 1995; Yamagata *et al.*, 1996; Dumont-Girard *et al.*, 1998; Kent *et al.*, 2005; Codina-Busqueta *et al.*, 2011; Vong *et al.*, 2011).

Galley e Danska (1995) demonstraram que o repertório de células T no pâncreas de camundongos NOD recém-diagnosticados para o DM-1 era diverso, sendo restrito na fase da insulite, quando as células T ainda estavam infiltrando no pâncreas.

Em outro estudo com camundongos NOD, também foi possível observar, no início do desenvolvimento do DM-1 (na fase de insulite), a restrição do repertório de

células T presentes no pâncreas, sendo a família Vβ1 a principal família em expansão clonal encontrada. Contudo, quando os animais tornaram-se diabéticos, foi observado o aumento da diversidade do repertório de células T presentes no pâncreas. Segundo os autores, o dano causado às células β pancreáticas devido à resposta imunológica desencadeada pelas células T inicialmente infiltradas poderia levar a liberação de novos antígenos presentes nas células β pancreáticas, desencadeando, subsequentemente, a ativação de células T com novas e diferentes especificidades (*antigen spreading*) e, consequentemente, aumentando e diversificando o repertório de TCRs usados pelas células T durante a progressão da doença (Drexler, Burtles e Hurtenbach, 1993).

Em humanos, também foi demonstrado que o repertório da cadeia Vβ do receptor da célula T não foi restrito nem no pâncreas e nem no sangue periférico de pacientes diabéticos recém-diagnosticados, entretanto, o repertório da cadeia Vα do receptor da célula T apresentou restrição no pâncreas desses mesmos pacientes, sendo que a região de CDR3 localizada na cadeia α do TCR apresentou a mesma sequência nos clones em expansão (Yamagata *et al.*, 1996).

Em 2005, Kent e colaboradores avaliaram o linfonodo pancreático de um paciente recém-diagnosticado para o DM-1 e de dois pacientes diabéticos com 15 ou mais anos de doença. Foi vista grande restrição da diversidade do repertório de células T nos dois pacientes com muitos anos de doença, nos quais mais da metade dos clones de célula T expressavam a mesma cadeia Vβ, enquanto no paciente recém-diagnosticado houve ampla e diversa distribuição das famílias Vβs. Além disso, as células T que estavam em expansão oligoclonal nos pacientes com muitos anos de doença possuíam a mesma sequência, a qual foi específica para a insulina (Kent *et al.*, 2005).

Em nosso trabalho, também foi observado que o CS foi significativamente menor 180 dias após o transplante quando comparado ao pré-transplante devido, provavelmente, a expansão periférica de células T observada nos períodos iniciais após o TACTH. Contudo, após o início da produção de células T *naive*, evidenciada em nosso trabalho pelo aumento dos níveis de TRECs no sangue periférico já no período D+360 pós-transplante, o CS foi gradualmente aumentando, atingindo valores basais normais nos períodos D+360 e D+720.

A expansão homeostática de células T (LIP) observada nos períodos iniciais após o TCTH tem sido descrita em vários trabalhos e é caracterizada pela expansão periférica de células T que permaneceram após a imunoablação ou que foram

reinfundidas junto com as CTH (Williams, Hakim e Gress, 2007; Jameson e Masopust, 2009). Gruta e colaboradores (2000) mostraram que a expansão periférica de células T em camundongos linfopênicos resultou em um repertório de células T restrito, com expansão oligoclonal das três famílias Vβ estudadas (Vβ 2, 8 e 10). Mackall e colaboradores (1996) também demonstraram, em modelo murino, que a expansão periférica de células T após o transplante de medula óssea foi dependente da apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I e II e resultou na reconstituição de um repertório restrito de células T.

Foi demonstrado que, em pacientes com leucemia submetidos ao transplante de medula óssea, o número de células T *naive* (célula T $CD4^{+}CD45RA^{+}RO^{-}$) foi muito pequeno um mês após o transplante, sendo a expansão periférica responsável pela reconstituição do repertório de linfócitos T durante os seis primeiros meses após o transplante. Além disso, o repertório de células T mostrou-se extremamente limitado até seis meses após o transplante, tornando-se diverso após o início da produção de células T *naive* pelo timo (Dumont-Girard *et al.*, 1998).

6.3 Frequências das famílias Vβ nos pacientes com DM-1 antes e após o TACTH

Apesar de não haver restrição do repertório de célula T no período pré-transplante, as famílias Vβ 7, 18, 19 e 20 apresentaram frequência significativamente aumentada nos pacientes com DM-1 nesse período quando comparada à frequência dos indivíduos sadios. A frequência da família Vβ 7 foi maior nos pacientes com DM-1, quando comparado ao grupo de indivíduos sadios, nos períodos D+180, D+360 e D+720 pós-TACTH. A família Vβ 18 apresentou frequência maior que nos indivíduos sadios em quase todos os períodos pós-transplante analisados (exceto no período D+1440). Além disso, as frequências das famílias Vβ 19 e 20 apresentaram-se significativamente elevadas em todos os períodos pós-transplante quando comparado ao grupo controle. Quando comparado ao período pré-transplante, foi observado um aumento da frequência da família Vβ 19 nos períodos D+1080, D+1440 e D+1800 e da família Vβ 20 nos períodos D+360 e D+1440. Interessantemente, houve aumento da frequência da família Vβ 22 nos períodos mais tardios após o transplante (D+1080 ao D+1800), em relação ao pré-transplante. Assim, nossos resultados mostraram que as famílias Vβ 7, 18, 19, 20 e 22 apresentaram frequência significativamente elevada em nosso estudo, sugerindo que células T que expressam essas cadeias Vβ possam

apresentar especificidade contra autoantígenos das células β pancreáticas e estarem envolvidas na destruição das mesmas.

Muitos trabalhos que avaliaram o repertório de células T envolvido no desenvolvimento do DM-1, tanto em humanos como em modelos animais, são controversos, não havendo consenso sobre quais são as principais famílias Vβ que se encontram em expansão clonal e em maior frequência nos indivíduos ou animais diabéticos (Hänninen *et al.*, 1992; Somoza *et al.*, 1994; Luppi *et al.*, 2000; Codina-Busqueta *et al.*, 2011; Vong *et al.*, 2011).

Assim como em nosso trabalho, Luppi e colaboradores (2000) identificaram alta frequência de células T que expressam a cadeia Vβ 7 em indivíduos recém-diagnosticados para o DM-1, em indivíduos diabéticos com dois ou mais anos de DM-1 e em indivíduos com alta predisposição genética para o desenvolvimento do DM-1, sendo que alguns desses indivíduos predispostos acabaram desenvolvendo o DM-1.

Codina-Busqueta e colaboradores (2011) avaliaram a diversidade de células T presente no pâncreas, no baço e no sangue periférico de um indivíduo recém-diagnosticado pra o DM-1. Nesse estudo, foi observado o predomínio de seis famílias Vβ (1, 7, 11, 17, 18 e 22) no pâncreas e das três famílias Vβ (1, 16 e 22) no baço desse paciente. Entretanto, somente a família Vβ 22 apresentou alta frequência no sangue periférico. Esses dados corroboram nossos resultados, indicando que as famílias Vβ7, 18 e 22 possam estar envolvidas com o desenvolvimento do DM-1.

Em outro estudo com um indivíduo com DM-1 recém-diagnosticado, foi observado amplo repertório de células T, contudo a família Vβ 8 foi a predominante (Hänninen *et al.*, 1992). Somoza e colaboradores (1994) identificaram maior frequência da família Vβ 1 no pâncreas de pacientes com DM-1.

Em um estudo recente, foi demonstrado que camundongos NOD $Ig\mu^{null}$ tornaram-se diabéticos e apresentaram uma progressiva infiltração de células T no pâncreas após o transplante de células B de camundongos NOD. A partir da análise do repertório de células T encontradas no pâncreas desses animais, foi possível observar o aumento da frequência de sete famílias Vβ (Vβ2, 10, 12, 14, 18, 19 e 20). No entanto, não foi observado o predomínio de nenhuma família no baço e linfonodos pancreáticos (Vong *et al.*, 2011). Além disso, os autores demonstraram que o número de famílias Vβ envolvidas na destruição das células β pancreáticas era menor no início da doença (fase de insulite), e que células expressando as cadeias Vβ18, 19 e 20 foram recrutadas para o pâncreas nos períodos mais tardios do DM-1 (o diabetes propriamente dito) (Vong *et*

al., 2011). Apesar dos camundongos NOD Igμ^{null} diabéticos, assim como os pacientes com DM-1 desse estudo, apresentarem elevada frequência da família Vβ 19, o papel dessa família no desenvolvimento do DM-1 ainda é bastante controverso, já que alguns autores demonstraram que o gene codificador dessa cadeia Vβ é um pseudogene e, portanto, sem atividade funcional (Arden *et al.*, 1995).

Além do aumento da frequência de algumas famílias Vβ após o TACTH, também identificamos a redução na frequência de diversas famílias em vários períodos após o transplante, como as famílias Vβ 9, 10, 11 e 17, sugerindo que ocorram mudanças qualitativas e quantitativas relevantes no repertório de células T após o TACTH.

6.4 Reconstituição do repertório de células T após o TACTH

Além da análise da diversidade e da distribuição dos fragmentos de CDR3 nas diferentes famílias Vβ estudadas, em nosso estudo, também foram avaliados os padrões de reconstituição dessas famílias após o TACTH (Muraro *et al.*, 2005). O padrão II de reconstituição (no qual ocorre a reconstituição da diversidade a partir de um repertório pré-transplante diverso) foi o principal padrão observado nos pacientes com DM-1 submetidos ao TACTH em todos os períodos pós-transplante, sendo que esse padrão foi predominante tanto nos pacientes do grupo DM-1<3anos como naqueles do grupo DM-1≥3anos.

Nossos resultados, assim como em outros estudos de pacientes com DAIs submetidos ao TACTH indicam a renovação e a reconstituição de um repertório diverso durante os dois e três primerios anos pós-transplante (Sun *et al.*, 2004; Muraro *et al.*, 2005; Muraro e Douek, 2006; Alexander *et al.*, 2009). Entretanto, ao contrário das outras DAIs, os pacientes com DM-1 não apresentaram restrição do repertório antes do transplante, provavelmente por se tratar de pacientes jovens e recém-diagnosticados como citado anteriormente.

Porém, nossos resultados revelaram um aumento da ocorrência do padrão de reconstituição IV, em que se observa a reconstituição de um repertório restrito a partir de um repertório pré-transplante diverso, no período D+1800 em relação aos outros períodos D+360, D+720, D+1080 e D+1440, indicando uma redução da diversidade e restrição do repertório do TCR em períodos mais tardios após o TACTH, nos quais a maioria dos pacientes com DM-1 já haviam retomado o uso de insulina exógena.

Alexander *et al*. (2009) mostraram que pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) apresentavam um repertório de células T restrito devido à expansão clonal de células T maduras expressando poucas famílias Vβ. Três meses após a infusão de células $CD34^+$ selecionadas, esses pacientes ainda apresentaram um repertório de células T restrito, porém com diferentes famílias em expansão clonal. Somente após o aumento da produção de células T *naive*, que se iniciou cerca de seis meses após o transplante, a diversidade do repertório de células T foi gradualmente normalizando. Alguns pacientes ainda apresentaram expansão clonal de algumas famílias até dois anos pós-transplante e a normalização completa do repertório de células T em todos os pacientes só ocorreu três anos após o transplante.

Em outro estudo, pacientes com LES submetidos ao TACTH, sem a seleção de $CD34^+$, apresentaram aumento nos níveis de TRECs no sangue periférico desses pacientes seis meses após o transplante. Esse aumento persistiu até dois anos após o transplante, quando então os níveis de TRECs se normalizaram (Wada *et al.*, 2011). Além disso, foi observado que esses pacientes apresentavam repertório de células T $CD4^+$ diverso antes do transplante, o qual se tornou restrito nos primeiros meses após o transplante, porém teve sua diversidade reestabelecida depois de um ano pós-TACTH. Por outro lado, esses pacientes apresentaram um repertório de células T $CD8^+$ bastante restrito no período pré-TACTH e somente dois anos após o transplante o repertório de células T $CD8^+$ tornou-se novo e diverso (Wada *et al.*, 2011).

Sun *et al*. (2006) observaram que pacientes com esclerose múltipla (EM) possuiam um repertório de células T restrito pré-TACTH, evidenciado por expansões relevantes de populações de células T expressando a família Vβ20 em todos os quatro pacientes estudados, e das famílias Vβ1 em dois e Vβ14 em um paciente. Nos primeiros meses após o TACTH, a restrição do repertório de células T persistiu, tornando-se mais diverso somente doze meses após o transplante. Além disso, foi observado que a maior diversidade do repertório de células T correlacionou-se diretamente com a produção de células T *naive* pelo timo. Conforme citado anteriormente, nesse trabalho a quantificação de TRECs revelou a reativação tímica nesses pacientes entre 9 a 12 meses após o transplante (Sun *et al.*, 2004).

Em outro estudo, Farge *et al.* (2005) mostraram uma perturbação do repertório em pacientes com esclerose sistêmica antes do TACTH, com poucas famílias Vβ policlonais e a frequência aumentada de famílias Vβ oligoclonais (ou *skewed*) e de famílias Vβ negativas, comparando-se aos controles pareados de acordo com a idade. O

repertório permaneceu perturbado até um ano pós-transplante em ambos os grupos de pacientes (grupo A, pacientes não responderam ao transplante ou tiveram recaída da doença; grupo B, pacientes que apresentaram resposta sustentada ao TACTH). Além disso, o trabalho mostrou uma tendência ao aumento da diversidade do repertório de células T no grupo A um ano após TACTH. Apesar da extensa depleção de células T no enxerto de CTHs, foi observada a persistência de 1-4 expansões oligloclonais de células T, presentes antes do TACTH e que reconstituíram após o mesmo.

Dados da literatura indicam que as células B e T de memória não são completamente removidas do sistema hematopoético e linfoide e de órgãos alvos, por qualquer que seja o regime de condicionamento (Tyndall e Saccardi, 2005; Van Wijk *et al.*, 2008; Couri, De Oliveira e Simões, 2012). Assim, os regimes de condicionamento não-mieloablativos, comumente usados nos protocolos clínicos de TACTH para DAIs, levam a imunoblação incompleta e poderiam explicar as recaídas (dependênca insulínica) observada nos pacientes com DM-1 do nosso estudo.

Além disso, vários estudos têm demonstrado que pacientes com DM-1 e camundongos NOD possuem células T efetoras mais resistentes à imunoablação (por vários regimes de condicionamento utilizados no TCTH) por serem menos sensíveis aos sinais indutores de apoptose, o que sugere que recaídas poderiam ser mais frequentes em pacientes com DM-1 (Colucci *et al.*, 1996; Lamhamedi-Cherradi *et al.*, 1998; Dosch *et al.*, 1999; Decallonne *et al.*, 2003; Steptoe *et al.*, 2004; Shklovskaya e Fazekas De St Groth, 2006; Kaminitz *et al.*, 2010).

Foi observado que camundongos NOD submetidos ao TCTH requerem doses maiores de irradiação para que ocorra depleção eficiente das células T. Entretanto, mesmo após doses supra-letais de irradiação, células T foram encontradas no sangue periférico desses animais, sugerindo que essas células são mais resistentes à apoptose (Steptoe *et al.*, 2004).

Além disso, Collucci e colaboradores (1996) demonstraram que a ciclofosfamida, uma importante droga imunossupressora utilizada em regimes de condicionamento para o TCTH, foi capaz de induzir a apoptose de células T de camundongos NOD e camundongos B6 (grupo controle). Contudo, as células de camundongos NOD foram mais resistentes à apoptose e consequentemente um número maior de células resistiu à imunossupressão, sendo detectadas nos animais após o uso da ciclofosfamida.

A resistência à apoptose observada nas células T efetoras periféricas de indivíduos com DM-1 e modelos animais pode ser devido a vários fatores. Ensaios funcionais de apoptose *in vitro* mostraram que células T de camundongos NOD são mais resistentes à apoptose devido a defeitos na atividade da caspase 8 (importante mediadora da via Fas-FasL), menor expressão do receptores Fas e FasL e maior expressão do gene anti-apoptótico Bclx (Lamhamedi-Cherradi *et al.*, 1998; Decallonne *et al.*, 2003).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que os pacientes com DM-1 que ficaram por mais tempo livres do uso de insulina (DM-1≥3anos) apresentaram menor frequência de células T $CD8^+$ específicas para autoantígenos das células β pancreáticas antes do transplante, quando comparados com o grupo DM-1<3anos. Após o transplante, houve reconstituição dessas células $CD8^+$ autorreativas específicas, sendo que o grupo DM-1≥3anos apresentou menor frequência dessas células quando comparados ao grupo DM-1<3anos em todos os períodos pós-transplante avaliados. Esses dados sugerem que as células T de memória não foram completamente removidas pelo regime de imunossupresão em altas doses utilizado nesses transplantes, e estas poderiam estar envolvidas com a restrição do repertório de células T e consequente recaída da doença nos pacientes com DM-1 nos períodos mais tardios após o transplante (dados não mostrados; manuscritos em preparação).

Embora a maioria dos pacientes com DM-1 do nosso estudo, que inicialmente ficaram livres de insulina, tenha retomado o uso da mesma após períodos de tempo variáveis após a IAD/TACTH, a resposta terapêutica foi promissora, pois a maioria dos pacientes alcançou independência insulínica completa por períodos prolongados e apresentou um aumento dos níveis séricos de peptídeo-C. A dosagem do peptídeo-C sérico é uma das formas mais comuns de se avaliar a preservação das células β e produção de insulina por essas células em indivíduos diabéticos (Palmer *et al.*, 2004; Rodacki, Milech e Oliveira, 2008; Hills e Brunskill, 2009). O peptídeo-C é um peptídeo que conecta as cadeias A e B da pró-insulina, que é liberado na corrente sanguínea quando a pró-insulina é clivada em insulina (Rodacki, Milech e Oliveira, 2008; Hills e Brunskill, 2009). Além disso, vários estudos vêm demonstrando que altos níveis de peptídeo-C previnem complicações crônicas do diabetes a longo prazo (Steffes *et al.*, 2003; Rebsomen *et al.*, 2008; Hills e Brunskill, 2009). Um estudo realizado pelo DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) mostrou que a presença de níveis elevados

de peptídeo-C associa-se com uma redução da incidência de retinopatia e nefropatia em pacientes com DM-1 (Steffes *et al.*, 2003).

6.5 Considerações finais

Em resumo, nossos resultados revelaram mudanças na composição do repertório de células T dos pacientes com DM-1 após a terapia de IAD/TACTH, evidenciadas por alterações qualitativas e quantitativas dos picos de CDR3 do TCR, sugerindo a reconstituição de um repertório de células T diverso até o período D+720. Embora tenha ocorrido reativação da função tímica após o transplante, evidenciada pelo aumento dos níveis de TRECs a partir do D+540 ao D+1800, a diversidade do repertório das células T medida pelo *complexity score* diminuiu a partir do D+900, sugerindo uma reconstituição tímica *de novo* de células T *naive* que expressam preferencialmente algumas cadeias Vβ e possivelmente especificidades limitadas.

A imunoablação incompleta demonstrada pela reconstituição periférica de clones de células $CD8^+$ autorreativas específicas para autoantígenos das células β pancreáticas nos pacientes com DM-1 após o TACTH (dados não mostrados; manuscritos em preparação), pode também ter sido responsável pela restrição do repertório de células T e consequente recaída da doença nos pacientes, principalmente em períodos mais tardios após o transplante.

Estas evidências imunológicas poderiam explicar a melhora clínica (independência insulínica) temporária observada na maioria dos pacientes após o transplante.

CONCLUSÕES

7 Conclusões

1. Não houve diferença entre os números de moléculas de TRECs no sangue periférico dos indivíduos sadios e dos pacientes com DM-1 no período pré-transplante.
2. Não foi observada diferença entre a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR de indivíduos sadios e a diversidade do repertório de pacientes com DM-1 no período pré-transplante, indicando que os pacientes diabéticos recém-diagnosticados possuem o repertório de células T diverso.
3. Os níveis de TRECs no sangue periférico dos pacientes com DM-1, tanto no grupo DM-1<3anos como no DM-1≥3anos, aumentaram significativamente a partir do D+540 após o TACTH, indicando a reativação da produção tímica de novas células T (*thymic rebound*).
4. Nos primeiros seis meses após o TACTH, os pacientes com DM-1 apresentaram uma restrição do repertório de células T, evidenciado pelos baixos níveis de TRECs e pelo baixo escore de complexidade da cadeia Vβ do TCR.
5. O escore de complexidade da cadeia Vβ do TCR dos pacientes com DM-1 diminuiu gradual e significativamente a partir do D+900 pós-transplante, tanto no grupo DM-1<3anos como no DM-≥3anos, demonstrando uma restrição do repertório nos períodos mais tardios após o transplante, quando a maioria dos pacientes havia retomado o uso de insulina.
6. Famílias Vβ com distribuição policlonal predominaram nos pacientes com DM-1 antes do transplante e durante os dois primeiros anos pós-transplante, porém o número de famílias Vβ com distribuição oligoclonal e monoclonal aumentou nos períodos mais tardios após o transplante (D+1080-D+1800).
7. Cinco famílias Vβ (7, 18, 19, 20 e 22) foram encontradas em expansão clonal nos pacientes com DM-1, sugerindo células T que expressam essas cadeias Vβ possam apresentar especificidade contra autoantígenos das células β pancreáticas e estarem envolvidas na destruição das mesmas. As famílias Vβ 7, 18, 19, 20 apresentaram-se em expansão clonal antes do transplante e se mantiveram com frequência elevada após o transplante, enquanto a família Vβ 22 apresentou aumento da frequência somente nos períodos mais tardios após o transplante.

8. Não foram encontradas diferenças nos níveis de TRECs e na diversidade do repertório de células T entre o grupo de pacientes com DM-1 que ficaram livres do uso de insulina por menos de três anos após o transplante (grupo DM-1<3anos) e o grupo de pacientes que ficaram livres do uso de insulina por três anos ou mais após o transplante (DM-1≥3anos), em todos os períodos avaliados.
9. Não foram encontradas correlações entre os níveis de TRECs e o *complexity score*.
10. Não foram encontradas correlações entre os níveis de TRECs e os valores de peptídeo-C e entre o *complexity score* e os valores de peptídeo-C.
11. Em geral, foram observadas mudanças na composição do repertório de células T dos pacientes com DM-1 após a terapia de IAD/TACTH, evidenciadas por alterações qualitativas e quantitativas dos picos de CDR3 do TCR, sugerindo a reconstituição de um repertório de células T diverso até o período D+720. Embora tenha ocorrido reativação da função tímica após o transplante, evidenciada pelo aumento dos níveis de TRECs a partir do D+540 ao D+1800, a diversidade do repertório das células T diminuiu a partir do D+900, sugerindo uma reconstituição tímica *de novo* de células T naive que expressam preferencialmente algumas cadeias Vβ. Estas evidências imunológicas poderiam explicar a melhora clínica (independência insulínica) temporária observada na maioria dos pacientes após o transplante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 Referências Bibliográficas

ABRAHAMSSON, S.; MURARO, P. A. Immune re-education following autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Autoimmunity,** v. 41, n. 8, p. 577-84, Dec 2008. ISSN 1607-842X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18958748 >.

ACHENBACH, P. et al. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. **J Clin Invest,** v. 114, n. 4, p. 589-97, Aug 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314696 >.

ALEXANDER, T. et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. **Blood,** v. 113, n. 1, p. 214-23, Jan 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824594 >.

ALPDOGAN, O. et al. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. **Blood,** v. 98, n. 7, p. 2256-65, Oct 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568014 >.

ANNACKER, O. et al. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. **J Immunol,** v. 166, n. 5, p. 3008-18, Mar 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207250 >.

ARDEN, B. et al. Human T-cell receptor variable gene segment families. **Immunogenetics,** v. 42, n. 6, p. 455-500, 1995. ISSN 0093-7711. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550092 >.

ARSTILA, T. P. et al. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. **Science,** v. 286, n. 5441, p. 958-61, Oct 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542151 >.

ATKINSON, M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med,** v. 2, n. 11, Nov 2012. ISSN 2157-1422. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125199 >.

ATKINSON, M. A. et al. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. **J Clin Invest,** v. 94, n. 5, p. 2125-9, Nov 1994. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7962558 >.

AULETTA, J. J.; LAZARUS, H. M. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. **Bone Marrow Transplant,** v. 35, n. 9, p. 835-57, May 2005. ISSN 0268-3369. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778723 >.

AZEVEDO, R. I. et al. Long-Term Immune Reconstitution of Naive and Memory T Cell Pools after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, Feb 2013. ISSN 1523-6536. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396243 >.

BADENHOOP, K. et al. Susceptibility and resistance alleles of human leukocyte antigen (HLA) DQA1 and HLA DQB1 are shared in endocrine autoimmune disease. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 80, n. 7, p. 2112-7, Jul 1995. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7608264 >.

BARCLAY, A. et al. Dietary management in diabetes. **Aust Fam Physician,** v. 39, n. 8, p. 579-83, Aug 2010. ISSN 0300-8495. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877753 >.

BAYER, A. L.; YU, A.; MALEK, T. R. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. **J Immunol,** v. 178, n. 7, p. 4062-71, Apr 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17371960 >.

BENNETT, S. T. et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. **Nat Genet,** v. 9, n. 3, p. 284-92, Mar 1995. ISSN 1061-4036. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7773291 >.

BERZINS, S. P. et al. Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks. **Trends Mol Med,** v. 8, n. 10, p. 469-76, Oct 2002. ISSN 1471-4914. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12383769 >.

BETTINI, M.; VIGNALI, D. A. T cell-driven initiation and propagation of autoimmune diabetes. **Curr Opin Immunol,** v. 23, n. 6, p. 754-60, Dec 2011. ISSN 1879-0372. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056379 >.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature,** v. 464, n. 7293, p. 1293-300, Apr 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20432533 >.

BOGDANOS, D. P. et al. Twin studies in autoimmune disease: genetics, gender and environment. **J Autoimmun,** v. 38, n. 2-3, p. J156-69, May 2012. ISSN 1095-9157. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177232 >.

BOGGI, U.; AMORESE, G.; MARCHETTI, P. Surgical techniques for pancreas transplantation. **Curr Opin Organ Transplant,** v. 15, n. 1, p. 102-11, Feb 2010. ISSN 1531-7013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010103 >.

BOHGAKI, T.; ATSUMI, T.; KOIKE, T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Autoimmun Rev,** v. 7, n. 3, p. 198-203, Jan 2008. ISSN 1568-9972. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18190878 >.

BOLOTIN, E. et al. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. **Blood,** v. 88, n. 5, p. 1887-94, Sep 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781449 >.

BOMBERGER, C. et al. Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34+ hematopoietic progenitors. **Blood,** v. 91, n. 7, p. 2588-600, Apr 1998. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516161 >.

BOYMAN, O. et al. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. **Eur J Immunol,** v. 39, n. 8, p. 2088-94, Aug 2009. ISSN 1521-4141. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19637200 >.

BURT, R. K. et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. **Lancet Neurol,** v. 8, n. 3, p. 244-53, Mar 2009. ISSN 1474-4422. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19186105 >.

BURT, R. K. et al. Effect of disease stage on clinical outcome after syngeneic bone marrow transplantation for relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. **Blood,** v. 91, n. 7, p. 2609-16, Apr 1998. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516163 >.

BURT, R. K. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: what have we learned? **J Autoimmun,** v. 30, n. 3, p. 116-20, May 2008. ISSN 0896-8411. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242956 >.

BURT, R. K. et al. The promise of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Bone Marrow Transplant,** v. 31, n. 7, p. 521-4, Apr 2003. ISSN 0268-3369. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692615 >.

BURT, R. K. et al. Treatment of autoimmune disease by intense immunosuppressive conditioning and autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Blood,** v. 92, n. 10, p. 3505-14, Nov 1998. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808541 >.

CHATENOUD, L. Immune therapy for type 1 diabetes mellitus-what is unique about anti-CD3 antibodies? **Nat Rev Endocrinol,** v. 6, n. 3, p. 149-57, Mar 2010. ISSN 1759-5037. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173776 >.

CHATENOUD, L.; BLUESTONE, J. A. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. **Nat Rev Immunol,** v. 7, n. 8, p. 622-32, Aug 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641665 >.

CHEN, Z. et al. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. **J Exp Med,** v. 202, n. 10, p. 1387-97, Nov 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301745 >.

CLAVE, E. et al. Thymic function recovery after unrelated donor cord blood or T-cell depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation correlates with leukemia relapse.

Front Immunol, v. 4, p. 54, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23459761 >.

CODINA-BUSQUETA, E. et al. TCR bias of in vivo expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1 diabetes. **J Immunol,** v. 186, n. 6, p. 3787-97, Mar 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21325620 >.

COLUCCI, F. et al. Programmed cell death in the pathogenesis of murine IDDM: resistance to apoptosis induced in lymphocytes by cyclophosphamide. **J Autoimmun,** v. 9, n. 2, p. 271-6, Apr 1996. ISSN 0896-8411. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8738973 >.

COOPER, G. S.; STROEHLA, B. C. The epidemiology of autoimmune diseases. **Autoimmun Rev,** v. 2, n. 3, p. 119-25, May 2003. ISSN 1568-9972. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848952 >.

COPPIETERS, K. T. et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. **J Exp Med,** v. 209, n. 1, p. 51-60, Jan 2012. ISSN 1540-9538. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213807 >.

COPPIETERS, K. T.; WIBERG, A.; VON HERRATH, M. G. Viral infections and molecular mimicry in type 1 diabetes. **APMIS,** v. 120, n. 12, p. 941-9, Dec 2012. ISSN 1600-0463. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23051179 >.

COURI, C. E.; DE OLIVEIRA, M. C.; SIMÕES, B. P. Risks, benefits, and therapeutic potential of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diabetes. **Curr Diab Rep,** v. 12, n. 5, p. 604-11, Oct 2012. ISSN 1539-0829. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864730 >.

COURI, C. E. et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA,** v. 301, n. 15, p. 1573-9, Apr 2009. ISSN 1538-3598. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366777 >.

COURI, C. E.; VOLTARELLI, J. C. Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus: a review of recent clinical trials. **Diabetol Metab Syndr,** v. 1, n. 1, p. 19, 2009. ISSN 1758-5996. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19835616 >.

CSORBA, T. R.; LYON, A. W.; HOLLENBERG, M. D. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. **Crit Rev Clin Lab Sci,** v. 47, n. 2, p. 51-71, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1549-781X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20545565 >.

DARLINGTON, P. J. et al. Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation. **Ann Neurol,** v. 73, n. 3, p. 341-54, Mar 2013. ISSN 1531-8249. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463494 >.

DAVIDSON, A.; DIAMOND, B. Autoimmune diseases. **N Engl J Med,** v. 345, n. 5, p. 340-50, Aug 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11484692 >.

DAVIS, M. M.; BJORKMAN, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. **Nature,** v. 334, n. 6181, p. 395-402, Aug 1988. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3043226 >.

DE KLEER, I. et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. **Blood,** v. 107, n. 4, p. 1696-702, Feb 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263787 >.

DE OLIVEIRA, G. L. et al. Up-regulation of fas and fasL pro-apoptotic genes expression in type 1 diabetes patients after autologous haematopoietic stem cell transplantation. **Clin Exp Immunol,** v. 168, n. 3, p. 291-302, Jun 2012. ISSN 1365-2249. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22519592 >.

DECALLONNE, B. et al. Defect in activation-induced cell death in non-obese diabetic (NOD) T lymphocytes. **J Autoimmun,** v. 20, n. 3, p. 219-26, May 2003. ISSN 0896-8411. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753807 >.

DEN BRABER, I. et al. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. **Immunity,** v. 36, n. 2, p. 288-97, Feb 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365666 >.

DOSCH, H. et al. Persistent T cell anergy in human type 1 diabetes. **J Immunol,** v. 163, n. 12, p. 6933-40, Dec 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10586096 >.

DOUEK, D. C. et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. **Nature,** v. 396, n. 6712, p. 690-5, Dec 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872319 >.

DOUEK, D. C. et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. **Lancet,** v. 355, n. 9218, p. 1875-81, May 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10866444 >.

DREXLER, K.; BURTLES, S.; HURTENBACH, U. Limited heterogeneity of T-cell receptor V beta gene expression in the early stage of insulitis in NOD mice. **Immunol Lett,** v. 37, n. 2-3, p. 187-96, Aug 1993. ISSN 0165-2478. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8258459 >.

DUMONT-GIRARD, F. et al. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. **Blood,** v. 92, n. 11, p. 4464-71, Dec 1998. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834254 >.

EISENBARTH, G. S. Update in type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 92, n. 7, p. 2403-7, Jul 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616634 >.

FARGE, D. et al. Analysis of immune reconstitution after autologous bone marrow transplantation in systemic sclerosis. **Arthritis Rheum,** v. 52, n. 5, p. 1555-63, May 2005. ISSN 0004-3591. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15880600 >.

FARGE, D. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. **Haematologica,** v. 95, n. 2, p. 284-92, Feb 2010. ISSN 1592-8721. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19773265 >.

FISH, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nat Rev Immunol,** v. 8, n. 9, p. 737-44, Sep 2008. ISSN 1474-1733. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18728636 >.

FRY, T. J.; MACKALL, C. L. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. **J Immunol,** v. 174, n. 11, p. 6571-6, Jun 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905493 >.

GALE, E. A. Spring harvest? Reflections on the rise of type 1 diabetes. **Diabetologia,** v. 48, n. 12, p. 2445-50, Dec 2005. ISSN 0012-186X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283244 >.

GALLEY, K. A.; DANSKA, J. S. Peri-islet infiltrates of young non-obese diabetic mice display restricted TCR beta-chain diversity. **J Immunol,** v. 154, n. 6, p. 2969-82, Mar 1995. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533189 >.

GARCIA, K. C. et al. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. **Science,** v. 274, n. 5285, p. 209-19, Oct 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824178 >.

GARCIA, K. C.; TEYTON, L.; WILSON, I. A. Structural basis of T cell recognition. **Annu Rev Immunol,** v. 17, p. 369-97, 1999. ISSN 0732-0582. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358763 >.

GARCÍA-OJEDA, M. E. et al. An alternate pathway for T cell development supported by the bone marrow microenvironment: recapitulation of thymic maturation. **J Exp Med,** v. 187, n. 11, p. 1813-23, Jun 1998. ISSN 0022-1007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607922 >.

GEDDES, M.; STOREK, J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. **Best Pract Res Clin Haematol,** v. 20, n. 2, p. 329-48, Jun 2007. ISSN 1521-6926. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448965 >.

GEENEN, V. et al. Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. **J Endocrinol,** v. 176, n. 3, p. 305-11, Mar 2003. ISSN 0022-0795. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12630915 >.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ,** v. 175, n. 2, p. 165-70, Jul 2006. ISSN 1488-2329. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847277 >.

GORONZY, J. J.; ZETTL, A.; WEYAND, C. M. T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. **Int Rev Immunol,** v. 17, n. 5-6, p. 339-63, 1998. ISSN 0883-0185. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036639 >.

GREMIZZI, C. et al. Impact of pancreas transplantation on type 1 diabetes-related complications. **Curr Opin Organ Transplant,** v. 15, n. 1, p. 119-23, Feb 2010. ISSN 1531-7013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010104 >.

GROUP, D. P. T.-.-T. D. S. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. **N Engl J Med,** v. 346, n. 22, p. 1685-91, May 2002. ISSN 1533-4406. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037147 >.

GURKAN, S. et al. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. **Am J Transplant,** v. 10, n. 9, p. 2132-41, Sep 2010. ISSN 1600-6143. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883548 >.

HAGEN, K. A. et al. A role for CD28 in lymphopenia-induced proliferation of CD4 T cells. **J Immunol,** v. 173, n. 6, p. 3909-15, Sep 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356139 >.

HAKIM, F. T. et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. **J Clin Invest,** v. 115, n. 4, p. 930-9, Apr 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15776111 >.

HAZENBERG, M. D. et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. **Blood,** v. 99, n. 9, p. 3449-53, May 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964316 >.

_____. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. **J Mol Med (Berl),** v. 79, n. 11, p. 631-40, Nov 2001. ISSN 0946-2716. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11715066 >.

HEIBER, J. F.; GEIGER, T. L. Context and location dependence of adaptive Foxp3(+) regulatory T cell formation during immunopathological conditions. **Cell Immunol,** v. 279, n. 1, p. 60-5, Sep 2012. ISSN 1090-2163. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23089195 >.

HEITGER, A. et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. **Blood,** v. 90, n. 2, p.

850-7, Jul 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9226186 >.

HENTSCHKE, P. et al. T-cell receptor Vbeta repertoire after myeloablative and reduced intensity conditioning allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **Scand J Immunol,** v. 61, n. 3, p. 285-94, Mar 2005. ISSN 0300-9475. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15787747 >.

HEROLD, K. C. et al. Treatment of patients with new onset Type 1 diabetes with a single course of anti-CD3 mAb Teplizumab preserves insulin production for up to 5 years. **Clin Immunol,** v. 132, n. 2, p. 166-73, Aug 2009. ISSN 1521-7035. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443276 >.

HEROLD, K. C. et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. **N Engl J Med,** v. 346, n. 22, p. 1692-8, May 2002. ISSN 1533-4406. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037148 >.

HIEMSTRA, H. S. et al. Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 98, n. 7, p. 3988-91, Mar 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274421 >.

HILLS, C. E.; BRUNSKILL, N. J. Cellular and physiological effects of C-peptide. **Clin Sci (Lond),** v. 116, n. 7, p. 565-74, Apr 2009. ISSN 1470-8736. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243312 >.

HONEYMAN, M. C. et al. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. **J Immunol,** v. 184, n. 4, p. 2204-10, Feb 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083660 >.

HONKANEN, J. et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. **J Immunol,** v. 185, n. 3, p. 1959-67, Aug 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592279 >.

HOUGH, R. E.; SNOWDEN, J. A.; WULFFRAAT, N. M. Haemopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases: a European perspective. **Br J Haematol,** v. 128, n. 4, p. 432-59, Feb 2005. ISSN 0007-1048. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15686452 >.

HUURMAN, V. A. et al. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 23, n. 4, p. 269-75, May 2007. ISSN 1520-7552. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17024692 >.

HÄNNINEN, A. et al. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Invest,** v. 90, n. 5, p. 1901-10, Nov 1992. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385478 >.

HÄRKÖNEN, T. et al. Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. **J Med Virol,** v. 66, n. 3, p. 340-50, Mar 2002. ISSN 0146-6615. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11793386 >.

HÜGLE, T.; DAIKELER, T. Stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Haematologica,** v. 95, n. 2, p. 185-8, Feb 2010. ISSN 1592-8721. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139390 >.

ITOH, N. et al. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. **J Clin Invest,** v. 92, n. 5, p. 2313-22, Nov 1993. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8227346 >.

JACOBSON, D. L. et al. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. **Clin Immunol Immunopathol,** v. 84, n. 3, p. 223-43, Sep 1997. ISSN 0090-1229. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9281381 >.

JAMESON, S. C.; MASOPUST, D. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. **Immunity,** v. 31, n. 6, p. 859-71, Dec 2009. ISSN 1097-4180. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064446 >.

JENKINS, A. J. et al. Increased serum kallistatin levels in type 1 diabetes patients with vascular complications. **J Angiogenes Res,** v. 2, p. 19, 2010. ISSN 2040-2384. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20860825 >.

JUST, H. L. et al. T-cell receptor excision circles (TREC) in CD4+ and CD8+ T-cell subpopulations in atopic dermatitis and psoriasis show major differences in the emission of recent thymic emigrants. **Acta Derm Venereol,** v. 88, n. 6, p. 566-72, 2008. ISSN 0001-5555. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002340 >.

KAMINITZ, A. et al. Immunosuppressive therapy exacerbates autoimmunity in NOD mice and diminishes the protective activity of regulatory T cells. **J Autoimmun,** v. 35, n. 2, p. 145-52, Sep 2010. ISSN 1095-9157. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20638242 >.

KARJALAINEN, J. et al. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med,** v. 327, n. 5, p. 302-7, Jul 1992. ISSN 0028-4793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1377788 >.

KARLSSON, M. G.; LUDVIGSSON, J. The ABBOS-peptide from bovine serum albumin causes an IFN-gamma and IL-4 mRNA response in lymphocytes from children with recent onset of type 1 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 47, n. 3, p. 199-207, Mar 2000. ISSN 0168-8227. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741569 >.

KATO, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature,** v. 441, n. 7089, p. 101-5, May 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625202 >.

KENT, S. C. et al. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. **Nature,** v. 435, n. 7039, p. 224-8, May 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15889096 >.

KEYMEULEN, B. et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. **N Engl J Med,** v. 352, n. 25, p. 2598-608, Jun 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972866 >.

_____. Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. **Diabetologia,** v. 53, n. 4, p. 614-23, Apr 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225393 >.

KIM, S. K. et al. Prevention of type I diabetes transfer by glutamic acid decarboxylase 65 peptide 206-220-specific T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 101, n. 39, p. 14204-9, Sep 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381770 >.

KIMMIG, S. et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. **J Exp Med,** v. 195, n. 6, p. 789-94, Mar 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901204 >.

KNIP, M.; AKERBLOM, H. K. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes,** v. 107 Suppl 3, p. S93-100, 1999. ISSN 0947-7349. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10522815 >.

KNIP, M.; SILJANDER, H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. **Autoimmun Rev,** v. 7, n. 7, p. 550-7, Jul 2008. ISSN 1568-9972. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625444 >.

KUKREJA, A.; MACLAREN, N. K. Autoimmunity and diabetes. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 84, n. 12, p. 4371-8, Dec 1999. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599690 >.

KUNZ, M.; IBRAHIM, S. M. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. **Mediators Inflamm,** v. 2009, p. 979258, 2009. ISSN 1466-1861. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884985 >.

KUROSAKA, D. et al. Decreased numbers of signal-joint T cell receptor excision circle-containing CD4+ and CD8+ cells in systemic lupus erythematosus patients. **Mod Rheumatol,** v. 17, n. 4, p. 296-300, 2007. ISSN 1439-7595. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17694262 >.

LAMHAMEDI-CHERRADI, S. E. et al. Resistance of T-cells to apoptosis in autoimmune diabetic (NOD) mice is increased early in life and is associated with dysregulated expression of Bcl-x. **Diabetologia,** v. 41, n. 2, p. 178-84, Feb 1998. ISSN 0012-186X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498651 >.

LAPLAUD, D. A. et al. Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. **Brain,** v. 127, n. Pt 5, p. 981-95, May 2004. ISSN 0006-8950. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985265 >.

LEHUEN, A. et al. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. **Nat Rev Immunol,** v. 10, n. 7, p. 501-13, Jul 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577267 >.

LERNMARK, A.; LARSSON, H. E. Immune therapy in type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol,** v. 9, n. 2, p. 92-103, Feb 2013. ISSN 1759-5037. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296174 >.

LI, D. S. et al. Do immunotherapy and beta cell replacement play a synergistic role in the treatment of type 1 diabetes? **Life Sci,** v. 85, n. 15-16, p. 549-56, Oct 2009. ISSN 1879-0631. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747492 >.

LI, L. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation modulates immunocompetent cells and improves β-cell function in Chinese patients with new onset of type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 97, n. 5, p. 1729-36, May 2012. ISSN 1945-7197. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419704 >.

LIBERT, C.; DEJAGER, L.; PINHEIRO, I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. **Nat Rev Immunol,** v. 10, n. 8, p. 594-604, Aug 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20651746 >.

LIEBERMAN, S. M. et al. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 100, n. 14, p. 8384-8, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815107 >.

LITTORIN, B. et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). **Diabetologia,** v. 49, n. 12, p. 2847-52, Dec 2006. ISSN 0012-186X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072585 >.

LUPPI, P. et al. Restricted TCR V beta gene expression and enterovirus infection in type I diabetes: a pilot study. **Diabetologia,** v. 43, n. 12, p. 1484-97, Dec 2000. ISSN 0012-186X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11151757 >.

LYNCH, H. E. et al. Thymic involution and immune reconstitution. **Trends Immunol,** v. 30, n. 7, p. 366-73, Jul 2009. ISSN 1471-4981. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540807 >.

LÉVY, Y. et al. Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. **Clin Infect Dis,** v. 55, n. 2, p. 291-300, Jul 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22550117 >.

MAAS, K. et al. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. **J Immunol,** v. 169, n. 1, p. 5-9, Jul 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077221 >.

MACKALL, C. L. et al. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. **J Immunol,** v. 156, n. 12, p. 4609-16, Jun 1996. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8648103 >.

MACKALL, C. L. et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. **N Engl J Med,** v. 332, n. 3, p. 143-9, Jan 1995. ISSN 0028-4793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7800006 >.

MACKALL, C. L. et al. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. **Blood,** v. 97, n. 5, p. 1491-7, Mar 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222398 >.

MACKALL, C. L. et al. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. **Blood,** v. 82, n. 8, p. 2585-94, Oct 1993. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7691265 >.

MACLAREN, N. et al. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. **J Autoimmun,** v. 12, n. 4, p. 279-87, Jun 1999. ISSN 0896-8411. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330299 >.

MADHOK, A. B. et al. Levels of recent thymic emigrant cells decrease in children undergoing partial thymectomy during cardiac surgery. **Clin Diagn Lab Immunol,** v. 12, n. 5, p. 563-5, May 2005. ISSN 1071-412X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879015 >.

MALMEGRIM, K.C.R. et al. Even high dose immunossupression followed by autologous hematopoeitic stem cell transplantation is not capable of inducing immune tolerance and persistent disease remission in newly-diagnosed type 1 diabetes patients. (Manuscript in preparation)

MALLONE, R.; BREZAR, V.; BOITARD, C. T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. **Clin Dev Immunol,** v. 2011, p. 513210, 2011. ISSN 1740-2530. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785617 >.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nat Immunol,** v. 2, n. 9, p. 816-22, Sep 2001. ISSN 1529-2908. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526392 >.

MANCEBO, E. et al. Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. **Clin Exp Immunol,** v. 154, n. 3, p. 375-83, Dec 2008. ISSN 1365-2249. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18811694 >.

MARRACK, P.; KAPPLER, J.; KOTZIN, B. L. Autoimmune disease: why and where it occurs. **Nat Med,** v. 7, n. 8, p. 899-905, Aug 2001. ISSN 1078-8956. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479621 >.

MARTIN-OROZCO, N. et al. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. **Eur J Immunol,** v. 39, n. 1, p. 216-24, Jan 2009. ISSN 1521-4141. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19130584 >.

MATHIEU, C. et al. Vitamin D and diabetes. **Diabetologia,** v. 48, n. 7, p. 1247-57, Jul 2005. ISSN 0012-186X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15971062 >.

MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. beta-Cell death during progression to diabetes. **Nature,** v. 414, n. 6865, p. 792-8, Dec 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742411 >.

MCCLORY, S. et al. Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil. **J Clin Invest,** v. 122, n. 4, p. 1403-15, Apr 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378041 >.

MELLADO-GIL, J. M.; COBO-VUILLEUMIER, N.; GAUTHIER, B. R. Islet β-Cell Mass Preservation and Regeneration in Diabetes Mellitus: Four Factors with Potential Therapeutic Interest. **J Transplant,** v. 2012, p. 230870, 2012. ISSN 2090-0015. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919462 >.

MEMON, S. A. et al. Quantitative analysis of T cell receptor diversity in clinical samples of human peripheral blood. **J Immunol Methods,** v. 375, n. 1-2, p. 84-92, Jan 2012. ISSN 1872-7905. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21986106 >.

MENSAH-BROWN, E. et al. Functional capacity of macrophages determines the induction of type 1 diabetes. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1084, p. 49-57, Nov 2006. ISSN 0077-8923. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151292 >.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature,** v. 442, n. 7098, p. 39-44, Jul 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823444 >.

MILLER, F. W. et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health

Sciences Expert Panel Workshop. **J Autoimmun,** v. 39, n. 4, p. 259-71, Dec 2012. ISSN 1095-9157. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739348 >.

MURARO, P. A. et al. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. **J Neuroimmunol,** v. 127, n. 1-2, p. 149-59, Jun 2002. ISSN 0165-5728. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044987 >.

MURARO, P. A.; DOUEK, D. C. Renewing the T cell repertoire to arrest autoimmune aggression. **Trends Immunol,** v. 27, n. 2, p. 61-7, Feb 2006. ISSN 1471-4906. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406806 >.

MURARO, P. A. et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. **J Exp Med,** v. 201, n. 5, p. 805-16, Mar 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738052 >.

MURARO, P. A.; MARTIN, R. Immunological questions on hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. **Bone Marrow Transplant,** v. 32 Suppl 1, p. S41-4, Aug 2003. ISSN 0268-3369. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12931240 >.

NA, I. K. et al. Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin(R)) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. **Haematologica,** v. 98, n. 1, p. 23-30, Jan 2013. ISSN 1592-8721. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22801968 >.

NAKAYAMA, M. Insulin as a key autoantigen in the development of type 1 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 27, n. 8, p. 773-7, Nov 2011. ISSN 1520-7560. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22069258 >.

NARENDRAN, P.; ESTELLA, E.; FOURLANOS, S. Immunology of type 1 diabetes. **QJM,** v. 98, n. 8, p. 547-56, Aug 2005. ISSN 1460-2725. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955793 >.

OKAJIMA, M. et al. Analysis of T cell receptor Vbeta diversity in peripheral CD4 and CD8 T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. **Clin Exp Immunol,** v. 155, n. 2, p. 166-72, Feb 2009. ISSN 1365-2249. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19040601 >.

ORBAN, T. et al. Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet,** v. 378, n. 9789, p. 412-9, Jul 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719096 >.

PACKER, A. N.; MURARO, P. A. Optimized clonotypic analysis of T-cell receptor repertoire in immune reconstitution. **Exp Hematol,** v. 35, n. 3, p. 516-21, Mar 2007. ISSN 0301-472X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17309832 >.

PALMER, J. P. et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. **Diabetes,** v. 53, n. 1, p. 250-64, Jan 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693724 >.

PANNETIER, C. et al. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 90, n. 9, p. 4319-23, May 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8483950 >.

PANNETIER, C.; EVEN, J.; KOURILSKY, P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. **Immunol Today,** v. 16, n. 4, p. 176-81, Apr 1995. ISSN 0167-5699. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7734044 >.

PARVING, H. H. et al. Cyclosporine nephrotoxicity in type 1 diabetic patients. A 7-year follow-up study. **Diabetes Care,** v. 22, n. 3, p. 478-83, Mar 1999. ISSN 0149-5992. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10097932 >.

PESCOVITZ, M. D. et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. **N Engl J Med,** v. 361, n. 22, p. 2143-52, Nov 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940299 >.

PETZOLD, C. et al. Dendritic cell-targeted pancreatic beta-cell antigen leads to conversion of self-reactive CD4(+) T cells into regulatory T cells and promotes immunotolerance in NOD mice. **Rev Diabet Stud,** v. 7, n. 1, p. 47-61, 2010. ISSN 1614-0575. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703438 >.

PIDO-LOPEZ, J.; IMAMI, N.; ASPINALL, R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. **Clin Exp Immunol,** v. 125, n. 3, p. 409-13, Sep 2001. ISSN 0009-9104. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11531948 >.

PIERDOMINICI, M. et al. Biased T-cell receptor repertoires in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). **Clin Exp Immunol,** v. 132, n. 2, p. 323-31, May 2003. ISSN 0009-9104. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12699424 >.

POCIOT, F.; MCDERMOTT, M. F. Genetics of type 1 diabetes mellitus. **Genes Immun,** v. 3, n. 5, p. 235-49, Aug 2002. ISSN 1466-4879. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140742 >.

POPAT, U.; KRANCE, R. Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disorders: the American perspective. **Br J Haematol,** v. 126, n. 5, p. 637-49, Sep 2004. ISSN 0007-1048. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15327514 >.

REBSOMEN, L. et al. C-Peptide effects on renal physiology and diabetes. **Exp Diabetes Res,** v. 2008, p. 281536, 2008. ISSN 1687-5303. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509500 >.

RIOUX, J. D.; ABBAS, A. K. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. **Nature,** v. 435, n. 7042, p. 584-9, Jun 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931210 >.

RODACKI, M.; MILECH, A.; OLIVEIRA, J. E. [C-peptide residual secretion makes difference on type 1 diabetes management?]. **Arq Bras Endocrinol Metabol,** v. 52, n. 2, p. 322-33, Mar 2008. ISSN 1677-9487. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438543 >.

ROEP, B. O.; PEAKMAN, M. Diabetogenic T lymphocytes in human Type 1 diabetes. **Curr Opin Immunol,** v. 23, n. 6, p. 746-53, Dec 2011. ISSN 1879-0372. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22051340 >.

ROEP, B. O. et al. Plasmid-Encoded Proinsulin Preserves C-Peptide While Specifically Reducing Proinsulin-Specific CD8+ T Cells in Type 1 Diabetes. **Sci Transl Med,** v. 5, n. 191, p. 191ra82, Jun 2013. ISSN 1946-6242. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23803704 >.

RUFFNER, M. A.; ROBBINS, P. D. Dendritic cells transduced to express interleukin 4 reduce diabetes onset in both normoglycemic and prediabetic nonobese diabetic mice. **PLoS One,** v. 5, n. 7, p. e11848, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686610 >.

RYAN, E. A. et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. **Diabetes,** v. 54, n. 7, p. 2060-9, Jul 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983207 >.

RYBA-STANISŁAWOWSKA, M. et al. Loss of the balance between CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes. **Hum Immunol**, Feb 2013. ISSN 1879-1166. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395729 >.

SAITO, H. et al. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. **Science,** v. 280, n. 5361, p. 275-8, Apr 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535655 >.

SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nat Rev Immunol,** v. 10, n. 7, p. 490-500, Jul 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559327 >.

SATO, K. et al. Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. **J Exp Med,** v. 182, n. 3, p. 759-67, Sep 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650483 >.

SCHNEIDER, D. A.; KRETOWICZ, A. M.; VON HERRATH, M. G. Emerging immune therapies in type 1 diabetes and pancreatic islet transplantation. **Diabetes Obes Metab**, Nov 2012. ISSN 1463-1326. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23194064 >.

SHAPIRO, A. M. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N Engl J Med,** v. 343, n. 4, p. 230-8, Jul 2000. ISSN 0028-4793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911004 >.

SHKLOVSKAYA, E.; FAZEKAS DE ST GROTH, B. Severely impaired clonal deletion of CD4+ T cells in low-dose irradiated mice: role of T cell antigen receptor and IL-7 receptor signals. **J Immunol,** v. 177, n. 12, p. 8320-30, Dec 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142728 >.

SILVA, R. C.; DIB, S. A. Imunologia Clínica do *Diabetes Mellitus* do tipo 1. In: VOLTARELLI, J. C. et al. **Imunologia Clínica na Prática Médica.** São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 11.1, p. 242-253.

SILVERSTEIN, J. et al. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med,** v. 319, n. 10, p. 599-604, Sep 1988. ISSN 0028-4793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3045545 >.

SMYTH, D. J. et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. **Nat Genet,** v. 38, n. 6, p. 617-9, Jun 2006. ISSN 1061-4036. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699517 >.

SNARSKI, E. et al. Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type I. **Bone Marrow Transplant,** v. 46, n. 4, p. 562-6, Apr 2011. ISSN 1476-5365. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581881 >.

SOMECH, R. T-cell receptor excision circles in primary immunodeficiencies and other T-cell immune disorders. **Curr Opin Allergy Clin Immunol,** v. 11, n. 6, p. 517-24, Dec 2011. ISSN 1473-6322. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971333 >.

SOMOZA, N. et al. Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. **J Immunol,** v. 153, n. 3, p. 1360-77, Aug 1994. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913115 >.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu Rev Immunol,** v. 23, p. 683-747, 2005. ISSN 0732-0582. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771584 >.

STEFFES, M. W. et al. Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. **Diabetes Care,** v. 26, n. 3, p. 832-6, Mar 2003. ISSN 0149-5992. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610045 >.

STEPTOE, R. J. et al. Persistence of recipient lymphocytes in NOD mice after irradiation and bone marrow transplantation. **J Autoimmun,** v. 22, n. 2, p. 131-8, Mar

2004. ISSN 0896-8411. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987741 >.

STILLER, C. R. et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. **Science,** v. 223, n. 4643, p. 1362-7, Mar 1984. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6367043 >.

STOREK, J. et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. **Blood,** v. 98, n. 13, p. 3505-12, Dec 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739150 >.

_____. Early recovery of CD4 T cell receptor diversity after "lymphoablative" conditioning and autologous CD34 cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant,** v. 14, n. 12, p. 1373-9, Dec 2008. ISSN 1523-6536. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041059 >.

SULLIVAN, K. M.; MURARO, P.; TYNDALL, A. Hematopoietic cell transplantation for autoimmune disease: updates from Europe and the United States. **Biol Blood Marrow Transplant,** v. 16, n. 1 Suppl, p. S48-56, Jan 2010. ISSN 1523-6536. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895895 >.

SUN, W. et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire and myelin-reactive T cells reconstituted from autologous haematopoietic stem-cell grafts in multiple sclerosis. **Brain,** v. 127, n. Pt 5, p. 996-1008, May 2004. ISSN 0006-8950. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985264 >.

SURH, C. D.; SPRENT, J. Homeostasis of naive and memory T cells. **Immunity,** v. 29, n. 6, p. 848-62, Dec 2008. ISSN 1097-4180. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100699 >.

SUTHERLAND, D. E.; GRUESSNER, R. W.; GRUESSNER, A. C. Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. **World J Surg,** v. 25, n. 4, p. 487-96, Apr 2001. ISSN 0364-2313. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344403 >.

SYKES, M.; NIKOLIC, B. Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. **Nature,** v. 435, n. 7042, p. 620-7, Jun 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931215 >.

TAKADA, K.; JAMESON, S. C. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. **Nat Rev Immunol,** v. 9, n. 12, p. 823-32, Dec 2009. ISSN 1474-1741. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935802 >.

TALVENSAARI, K. et al. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. **Blood,** v. 99, n. 4, p. 1458-64, Feb 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830500 >.

TAYLOR, K. N. et al. Induction of FoxP3+CD4+25+ regulatory T cells following hemopoietic stem cell transplantation: role of bone marrow-derived facilitating cells. **J**

Immunol, v. 179, n. 4, p. 2153-62, Aug 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675474 >.

TOUBERT, A. et al. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. **Tissue Antigens,** v. 79, n. 2, p. 83-9, Feb 2012. ISSN 1399-0039. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22220718 >.

TYNDALL, A. et al. Treatment of systemic sclerosis with autologous haemopoietic stem cell transplantation. **Lancet,** v. 349, n. 9047, p. 254, Jan 1997. ISSN 0140-6736. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9014919 >.

TYNDALL, A.; GRATWOHL, A. Haemopoietic stem and progenitor cells in the treatment of severe autoimmune diseases. **Ann Rheum Dis,** v. 55, n. 3, p. 149-51, Mar 1996. ISSN 0003-4967. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8712875 >.

TYNDALL, A.; SACCARDI, R. Haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease: results from phase I/II studies, prospective randomized trials and future directions. **Clin Exp Immunol,** v. 141, n. 1, p. 1-9, Jul 2005. ISSN 0009-9104. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958063 >.

VAN BEKKUM, D. W. Experimental basis of hematopoietic stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. **J Leukoc Biol,** v. 72, n. 4, p. 609-20, Oct 2002. ISSN 0741-5400. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377928 >.

_____. Experimental basis for the treatment of autoimmune diseases with autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant,** v. 32 Suppl 1, p. S37-9, Aug 2003. ISSN 0268-3369. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12931239 >.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev,** v. 91, n. 1, p. 79-118, Jan 2011. ISSN 1522-1210. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248163 >.

VAN HEIJST, J. W. et al. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. **Nat Med,** v. 19, n. 3, p. 372-7, Feb 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435170 >.

VAN WIJK, F. et al. Regulatory T cells in autologous stem cell transplantation for autoimmune disease. **Autoimmunity,** v. 41, n. 8, p. 585-91, Dec 2008. ISSN 1607-842X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18958758 >.

VARDANYAN, M. et al. Pancreas vs. islet transplantation: a call on the future. **Curr Opin Organ Transplant,** v. 15, n. 1, p. 124-30, Feb 2010. ISSN 1531-7013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009930 >.

VILLASEÑOR, J.; BENOIST, C.; MATHIS, D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. **Immunol Rev,** v. 204, p. 156-64, Apr 2005. ISSN 0105-2896. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790357 >.

VOLTARELLI, J. C.; COURI, C. E. Stem cell transplantation for type 1 diabetes mellitus. **Diabetol Metab Syndr,** v. 1, n. 1, p. 4, 2009. ISSN 1758-5996. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19825196 >.

VOLTARELLI, J. C. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for type 1 diabetes. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1150, p. 220-9, Dec 2008. ISSN 1749-6632. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120300 >.

_____. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA,** v. 297, n. 14, p. 1568-76, Apr 2007. ISSN 1538-3598. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426276 >.

VON HERRATH, M. Immunology: insulin trigger for diabetes. **Nature,** v. 435, n. 7039, p. 151-2, May 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15889071 >.

VONG, A. M. et al. Spectratyping analysis of the islet-reactive T cell repertoire in diabetic NOD Igμ(null) mice after polyclonal B cell reconstitution. **J Transl Med,** v. 9, p. 101, 2011. ISSN 1479-5876. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722394 >.

WADA, H. et al. Immune recovery after autologous PBSC transplantation without in vitro graft manipulation for refractory systemic lupus erythematosus. **Bone Marrow Transplant,** v. 46, n. 11, p. 1450-4, Nov 2011. ISSN 1476-5365. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243022 >.

WHITE, S. A.; SHAW, J. A.; SUTHERLAND, D. E. Pancreas transplantation. **Lancet,** v. 373, n. 9677, p. 1808-17, May 2009. ISSN 1474-547X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465236 >.

WILLIAMS, K. M.; GRESS, R. E. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. **Best Pract Res Clin Haematol,** v. 21, n. 3, p. 579-96, Sep 2008. ISSN 1521-6926. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790456 >.

WILLIAMS, K. M.; HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. **Semin Immunol,** v. 19, n. 5, p. 318-30, Oct 2007. ISSN 1044-5323. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023361 >.

WINGARD, J. R.; HSU, J.; HIEMENZ, J. W. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. **Infect Dis Clin North Am,** v. 24, n. 2, p. 257-72, Jun 2010. ISSN 1557-9824. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466269 >.

WINSTEAD, C. J.; FRASER, J. M.; KHORUTS, A. Regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T cells selectively inhibit the spontaneous form of lymphopenia-induced proliferation of

naive T cells. **J Immunol,** v. 180, n. 11, p. 7305-17, Jun 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18490730 >.

WONG, F. S. et al. To B or not to B--pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes. **Curr Opin Immunol,** v. 22, n. 6, p. 723-31, Dec 2010. ISSN 1879-0372. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050736 >.

WU, C. J. et al. Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. **Blood,** v. 95, n. 1, p. 352-9, Jan 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10607724 >.

WULFFRAAT, N. et al. Autologous haemopoietic stem-cell transplantation in four patients with refractory juvenile chronic arthritis. **Lancet,** v. 353, n. 9152, p. 550-3, Feb 1999. ISSN 0140-6736. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028984 >.

XIU, Y. et al. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. **J Immunol,** v. 180, n. 5, p. 2863-75, Mar 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292508 >.

YAMAGATA, K. et al. Dominant TCR alpha-chain clonotypes and interferon-gamma are expressed in the pancreas of patients with recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 34, n. 1, p. 37-46, Sep 1996. ISSN 0168-8227. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968689 >.

YANABA, K. et al. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. **Immunol Rev,** v. 223, p. 284-99, Jun 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18613843 >.

YAOCHITE, J. N. et al. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. **Immunobiology,** v. 218, n. 3, p. 338-52, Mar 2013. ISSN 1878-3279. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704522 >.

YASSAI, M. B. et al. A clonotype nomenclature for T cell receptors. **Immunogenetics,** v. 61, n. 7, p. 493-502, Jul 2009. ISSN 1432-1211. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568742 >.

YU, L. et al. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 97, n. 4, p. 1701-6, Feb 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677521 >.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **J Clin Invest,** v. 116, n. 7, p. 2022-32, Jul 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16767222 >.

ZHANG, L. et al. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8+ Treg cells are associated with immunological remission of lupus. **J Immunol,** v. 183, n. 10, p. 6346-58, Nov 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841178 >.

ZHANG, S. L.; BHANDOOLA, A. Losing TREC with age. **Immunity,** v. 36, n. 2, p. 163-5, Feb 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365662 >.

APÊNDICES E ANEXOS

9 Apêndices

APÊNDICE A

Tabela A.1. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 CTO (número 1) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1080	D+1260	D+1620
VB1	0,76	1,08	1,88	1,05	4,50	2,50	3,18	2,48	1,66
VB2	0,03	3,17	0,55	6,04	4,91	7,03	0,33	1,01	0,52
VB3	0,06	7,71	7,56	5,83	10,61	6,99	1,16	4,14	4,44
VB4	5,82	3,23	2,39	4,40	6,78	2,24	3,22	2,69	7,35
VB5	6,12	0,35	10,98	10,79	10,51	2,05	2,07	0,13	4,52
VB6	10,22	7,31	9,18	10,03	0,05	12,68	28,59	3,10	1,36
VB7	6,19	2,75	3,02	7,61	8,46	2,52	3,28	7,76	7,25
VB8	3,26	0,00	0,00	8,18	6,07	0,29	0,00	1,71	0,00
VB9	3,87	0,00	1,04	2,81	0,00	0,00	0,12	0,10	0,00
VB10	0,00	1,35	0,21	2,66	5,24	1,26	0,69	0,50	0,55
VB11	4,55	0,00	0,83	0,00	7,60	0,33	0,71	0,11	0,30
VB12	6,64	0,00	0,00	0,00	5,02	0,00	0,00	0,00	0,00
VB13	5,07	10,28	11,51	7,85	8,34	5,28	8,65	3,67	6,87
VB14	3,61	3,86	0,58	4,59	5,98	7,30	0,96	8,47	9,37
VB15	9,21	6,88	0,90	4,92	0,03	0,26	0,57	7,10	0,65
VB16	4,66	2,32	0,26	5,35	0,00	0,00	0,72	6,12	1,02
VB17	2,32	0,50	2,05	3,06	5,34	0,96	0,13	2,11	0,00
VB18	6,84	7,62	1,06	1,35	5,99	6,61	3,87	2,77	6,75
VB19	1,15	2,47	0,13	1,08	1,03	2,34	3,30	2,84	7,55
VB20	2,05	2,58	3,35	0,30	3,11	5,79	3,64	3,84	7,17
VB21	5,51	14,94	12,65	3,69	0,06	11,02	5,52	17,16	2,05
VB22	0,11	20,27	27,25	2,99	0,00	18,32	28,21	21,20	29,30
VB23	11,95	1,30	2,34	5,23	0,00	3,79	0,83	0,27	0,99
VB24	0,00	0,00	0,28	0,20	0,36	0,47	0,25	0,74	0,34

Tabela A.2. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 FCC (número 2) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+540	D+720	D+900	D+1080	D+1260	D+1800
VB1	1,68	2,34	1,09	4,49	1,57	1,49	2,07	2,21
VB2	3,94	2,22	6,70	7,03	7,99	7,64	6,34	6,47
VB3	0,46	10,01	9,58	5,48	8,66	5,47	12,24	7,47
VB4	3,17	3,59	2,46	2,66	2,43	3,10	4,13	4,09
VB5	7,87	1,64	15,25	0,36	0,67	8,36	14,38	0,14
VB6	19,77	2,58	12,45	9,49	6,48	1,96	2,32	25,79
VB7	5,45	6,30	5,34	6,28	5,59	2,17	4,67	4,24
VB8	0,00	0,23	0,00	1,88	1,54	0,00	0,00	0,46
VB9	0,22	0,27	0,14	0,54	0,15	1,28	0,20	0,00
VB10	0,22	0,37	0,14	0,28	1,21	1,14	0,88	3,06
VB11	0,25	0,77	0,07	0,57	0,19	0,13	0,10	0,29
VB12	0,00	0,21	0,11	0,70	0,00	1,34	0,00	0,47
VB13	13,60	6,88	5,40	5,47	6,96	8,24	6,14	8,60
VB14	8,00	10,77	3,83	5,01	9,40	8,13	5,74	0,49
VB15	1,36	8,53	1,95	8,83	1,09	9,62	6,34	2,84
VB16	6,65	4,01	0,62	4,13	1,23	0,35	2,13	7,08
VB17	0,19	0,34	0,00	0,05	3,42	1,80	0,17	0,36
VB18	3,86	4,74	2,44	3,53	3,65	9,44	2,09	4,70
VB19	2,73	3,75	2,67	1,47	2,28	2,08	1,83	3,23
VB20	3,08	3,81	3,63	1,96	4,36	2,80	1,86	4,10
VB21	12,97	18,57	8,69	8,85	9,21	1,99	5,91	1,73
VB22	2,63	5,21	17,02	16,35	19,40	21,05	18,58	10,82
VB23	0,46	1,46	0,26	4,00	2,38	0,24	1,77	1,12
VB24	1,44	1,37	0,16	0,62	0,12	0,19	0,10	0,26

Tabela A.3. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 VTR (número 3) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720
VB1	5,37	1,61	2,06	4,41	6,04
VB2	5,87	10,19	4,65	4,02	3,21
VB3	4,81	8,54	0,62	6,56	6,36
VB4	4,17	3,34	3,75	5,73	3,89
VB5	2,75	29,30	0,91	6,25	11,59
VB6	0,14	6,30	3,10	9,54	9,95
VB7	6,83	4,98	9,60	3,07	1,65
VB8	2,48	0,00	2,07	7,15	3,31
VB9	2,24	0,09	0,00	6,62	2,75
VB10	2,24	0,42	0,58	1,32	2,35
VB11	4,26	0,61	1,32	2,47	4,02
VB12	0,26	0,00	0,00	0,28	2,19
VB13	8,72	0,00	7,78	7,73	1,22
VB14	4,15	1,06	0,60	6,46	5,41
VB15	10,04	4,92	4,64	1,00	6,22
VB16	6,73	7,75	2,84	3,93	6,95
VB17	2,95	0,29	0,00	4,32	3,23
VB18	4,44	6,59	5,21	5,03	3,77
VB19	0,55	2,33	3,26	0,56	0,41
VB20	1,03	4,26	4,30	0,82	1,82
VB21	7,56	0,11	13,17	1,85	2,72
VB22	6,14	5,82	25,88	5,87	7,18
VB23	6,25	0,34	2,88	4,98	3,44
VB24	0,02	1,16	0,79	0,03	0,31

Tabela A.4. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 TAS (número 4) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+360	D+540	D+720	D+960	D+1440	D+1800
VB1	3,06	1,13	4,35	3,59	1,54	2,12	1,71
VB2	4,56	0,19	4,10	4,52	4,47	0,60	0,00
VB3	5,41	7,62	4,98	4,71	3,75	0,19	3,68
VB4	2,38	3,88	1,64	2,10	1,90	3,21	2,25
VB5	10,36	7,89	9,95	7,27	0,18	0,13	9,14
VB6	7,13	9,18	7,54	6,45	12,12	12,03	15,77
VB7	5,71	9,35	3,66	4,97	8,81	4,28	4,47
VB8	4,47	2,69	4,28	4,41	3,41	0,61	0,55
VB9	3,62	0,11	4,00	4,58	0,10	0,11	0,13
VB10	1,21	5,98	4,56	4,94	0,78	0,27	0,20
VB11	2,24	2,26	0,22	3,66	0,00	0,00	0,00
VB12	1,21	0,00	1,41	1,42	0,49	0,00	0,00
VB13	7,72	5,14	8,24	5,95	5,23	8,88	7,76
VB14	4,13	3,26	3,44	3,13	5,65	7,82	8,02
VB15	6,06	4,50	5,97	4,73	4,45	4,83	12,72
VB16	5,25	4,43	4,57	5,53	10,58	1,14	0,74
VB17	2,91	0,14	4,06	3,27	0,29	0,23	0,07
VB18	4,31	4,99	4,22	5,06	2,30	2,60	2,35
VB19	0,54	2,66	0,44	0,52	2,04	2,91	2,46
VB20	1,18	3,53	0,89	3,23	3,22	2,87	2,42
VB21	3,33	3,65	6,31	3,94	6,72	12,07	11,71
VB22	8,29	16,84	7,04	7,45	13,80	23,04	10,35
VB23	4,84	0,38	4,12	4,29	7,08	9,76	2,62
VB24	0,09	0,20	0,00	0,30	1,10	0,33	0,88

Tabela A.5. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 GBA (número 5) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+660	D+840	D+1020	D+1200	D+1410	D+1600
VB1	2,11	3,72	1,89	3,47	0,94	0,96	1,04	5,00	1,63	5,98
VB2	4,66	4,84	5,68	7,13	6,56	0,96	4,20	10,27	4,16	13,80
VB3	5,72	6,29	8,14	6,99	5,73	5,17	4,21	9,72	8,25	0,08
VB4	3,01	3,06	3,15	6,32	1,72	1,28	1,63	3,41	2,67	2,63
VB5	6,78	6,63	2,08	0,04	0,47	10,26	12,61	0,28	10,69	0,08
VB6	7,49	8,60	8,21	8,50	3,83	9,66	12,43	0,62	8,37	0,09
VB7	7,12	5,21	5,28	5,48	8,91	9,27	5,97	3,35	2,28	9,01
VB8	2,54	4,60	5,83	0,00	0,00	1,27	1,52	0,00	0,97	0,00
VB9	1,81	3,81	1,18	4,30	4,44	2,25	1,72	1,86	1,09	0,00
VB10	1,15	1,47	0,64	0,04	0,17	0,08	0,88	0,69	0,68	2,70
VB11	3,05	1,02	0,40	0,40	0,15	0,49	0,39	0,54	1,75	3,39
VB12	2,20	0,53	0,00	3,01	0,00	1,12	0,37	0,00	0,12	0,57
VB13	6,00	7,45	13,22	9,64	6,76	6,06	4,44	8,29	4,60	8,82
VB14	5,40	3,39	6,29	6,61	5,73	4,92	4,03	2,79	5,66	0,00
VB15	8,13	3,24	1,54	8,58	4,67	4,07	5,98	9,65	5,78	5,52
VB16	5,36	3,95	4,22	8,13	1,05	9,29	1,28	9,67	4,82	13,64
VB17	2,90	2,49	0,08	0,68	4,53	0,56	2,04	1,73	2,44	5,69
VB18	3,96	6,26	2,24	2,09	3,09	1,38	2,07	4,15	1,67	2,84
VB19	0,68	0,67	1,61	0,79	1,42	1,32	1,17	3,53	1,39	2,57
VB20	0,71	0,62	1,61	0,99	1,66	1,35	1,13	3,82	1,54	2,99
VB21	4,72	5,14	1,85	3,46	12,92	9,03	8,16	3,63	8,15	14,41
VB22	7,15	7,72	7,79	5,29	20,27	15,25	11,41	14,68	17,41	0,20
VB23	6,96	8,88	16,79	7,64	4,62	3,08	10,47	2,16	2,75	4,98
VB24	0,40	0,39	0,28	0,40	0,35	0,93	0,86	0,15	1,13	0,00

Tabela A.6. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 LTF (número 6) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	Surto	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1260	D+1440	D+1800
VB1	2,05	2,21	4,16	2,85	1,63	1,45	2,59	1,85	4,44	1,76
VB2	6,49	8,04	7,37	5,77	3,34	2,11	7,40	8,53	1,61	2,25
VB3	6,24	6,33	6,70	5,82	4,28	1,46	9,44	12,74	10,33	5,28
VB4	2,05	1,57	1,65	1,70	1,64	4,10	3,74	4,64	11,65	2,31
VB5	9,48	3,39	0,58	8,42	11,67	14,06	12,70	6,78	0,18	4,34
VB6	9,22	0,40	5,00	5,08	12,13	11,04	12,47	15,56	0,43	0,30
VB7	4,88	8,64	3,08	4,43	6,75	2,27	3,45	4,33	4,81	4,40
VB8	1,38	3,87	1,73	3,49	1,64	3,74	1,32	0,80	0,32	6,57
VB9	1,13	1,29	3,05	2,22	0,00	0,30	0,00	0,23	0,17	0,07
VB10	2,17	4,09	5,10	2,48	0,51	0,30	0,19	1,04	0,21	0,16
VB11	2,53	1,76	2,31	2,59	1,30	0,00	0,00	0,32	0,41	0,16
VB12	0,08	0,07	0,72	0,79	0,47	0,00	1,07	0,00	0,00	0,00
VB13	7,32	8,30	8,06	4,91	5,89	6,81	4,26	3,03	8,47	12,54
VB14	4,70	0,00	5,71	4,87	5,07	2,28	5,59	1,95	0,30	16,08
VB15	5,05	1,73	10,18	5,74	3,71	5,88	6,45	0,98	1,12	2,60
VB16	7,51	8,65	10,95	6,44	2,76	6,42	7,38	1,08	2,51	1,52
VB17	1,80	1,64	0,07	3,33	1,45	1,79	1,53	0,55	0,17	0,08
VB18	2,43	3,46	2,59	4,23	2,47	2,05	0,66	3,93	5,02	2,44
VB19	1,25	1,44	1,37	0,83	1,60	2,06	1,67	4,34	5,63	2,71
VB20	2,13	3,62	1,78	3,13	1,59	3,36	3,20	4,16	5,67	1,62
VB21	6,41	9,43	7,04	4,66	7,66	4,44	2,74	10,91	3,17	5,01
VB22	8,26	11,68	7,11	10,00	13,40	18,16	10,77	11,75	32,87	27,12
VB23	5,11	8,09	3,43	6,03	8,21	5,42	0,62	0,31	0,18	0,39
VB24	0,35	0,29	0,26	0,19	0,82	0,49	0,75	0,20	0,34	0,31

Tabela A.7. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 MTM (número 7) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+750	D+930	D+1080	D+1260
VB1	2,88	3,75	3,39	4,80	1,32	1,19	1,46	1,25
VB2	4,64	6,17	10,65	5,15	4,97	1,13	7,63	0,15
VB3	4,50	1,34	3,44	5,43	9,27	8,60	8,17	1,69
VB4	1,79	2,11	2,05	2,06	2,88	2,75	2,67	2,90
VB5	0,14	0,10	6,03	1,57	4,90	9,50	10,24	14,06
VB6	0,93	9,11	0,07	6,48	9,80	13,55	7,44	14,29
VB7	4,15	3,66	1,91	3,48	3,08	7,10	3,94	2,17
VB8	8,05	1,84	0,85	2,70	1,47	1,90	2,37	0,34
VB9	1,85	0,09	0,52	3,12	0,79	0,58	0,00	0,47
VB10	3,25	0,10	1,33	2,54	0,62	1,96	2,66	0,44
VB11	1,18	0,10	0,09	0,32	0,17	0,44	0,65	0,11
VB12	0,18	0,00	0,00	1,75	0,45	1,21	0,73	0,00
VB13	11,00	8,92	11,72	6,44	5,89	4,24	3,23	8,47
VB14	4,29	0,05	4,37	2,69	3,03	1,67	4,03	1,05
VB15	7,30	0,00	0,00	1,95	1,00	2,61	2,15	2,46
VB16	6,54	12,03	11,37	5,80	0,97	5,46	7,24	4,64
VB17	3,15	0,44	0,15	2,65	0,64	0,20	2,47	0,14
VB18	5,46	2,23	1,99	4,94	3,99	2,57	4,50	1,97
VB19	1,79	2,10	1,78	1,44	2,32	1,33	1,28	2,06
VB20	5,34	6,34	3,53	6,16	7,61	4,80	5,77	4,50
VB21	4,67	10,43	13,40	5,47	10,98	7,97	5,98	14,90
VB22	12,89	27,97	20,96	14,57	20,51	14,72	13,82	20,56
VB23	2,83	0,10	0,32	5,04	1,81	3,87	0,60	1,00
VB24	1,17	0,99	0,08	3,46	1,53	0,64	0,97	0,38

Tabela A.8. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 PMR (número 8) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1080	D+1260	D+1440	D+1800
VB1	0,89	1,43	2,91	3,15	3,65	1,69	4,93	2,82	2,00	1,87
VB2	4,67	4,97	4,04	1,15	3,97	5,90	4,27	0,93	7,02	0,11
VB3	5,56	6,01	5,55	5,97	4,91	6,75	6,32	6,03	2,00	6,17
VB4	6,77	3,79	4,38	2,87	3,32	3,34	6,09	2,44	4,30	3,22
VB5	4,07	8,60	7,33	7,38	8,72	5,96	4,10	0,30	9,36	25,67
VB6	8,68	9,72	6,71	7,08	0,64	10,19	8,96	5,04	1,35	0,31
VB7	1,89	6,11	5,10	4,36	5,34	2,94	3,11	6,93	6,01	4,36
VB8	4,96	5,01	4,35	5,22	3,31	5,74	2,05	2,29	0,00	1,56
VB9	4,65	1,48	2,54	4,60	6,67	1,07	0,21	0,11	0,09	0,70
VB10	0,42	2,73	2,62	0,02	2,84	1,68	0,57	1,22	0,29	0,62
VB11	2,86	2,36	3,66	0,02	4,89	1,46	0,07	0,21	1,51	1,79
VB12	2,41	2,47	1,93	2,10	3,11	1,31	0,00	0,00	0,30	0,00
VB13	8,00	7,00	5,46	9,54	6,28	10,47	16,60	13,94	9,07	13,76
VB14	5,24	3,30	3,84	6,68	3,92	3,49	0,06	2,31	3,58	0,86
VB15	6,82	5,93	7,07	7,37	8,04	0,29	0,63	22,03	6,00	0,00
VB16	5,48	2,40	3,64	5,99	4,55	3,96	0,31	16,59	0,68	1,79
VB17	3,45	4,83	4,13	3,67	4,34	4,22	5,29	0,00	0,23	1,62
VB18	5,24	4,57	5,31	5,97	6,12	4,70	1,27	3,14	2,56	3,80
VB19	0,58	0,43	0,35	0,53	0,49	0,40	0,84	3,41	2,98	3,72
VB20	0,72	0,52	3,15	0,88	1,83	2,14	0,88	3,47	5,28	4,02
VB21	5,49	4,87	4,20	3,97	3,78	5,96	14,05	3,94	13,45	17,08
VB22	5,81	7,33	5,09	7,10	5,86	8,35	19,27	2,60	20,86	6,58
VB23	5,20	4,03	6,22	4,32	3,02	6,86	0,00	0,14	0,93	0,25
VB24	0,12	0,09	0,43	0,05	0,41	1,12	0,14	0,12	0,17	0,15

Tabela A.9. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 WSL (número 9) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+1800
VB1	3,70	4,30	3,58	6,96	1,68
VB2	3,94	3,55	5,54	6,17	7,84
VB3	5,38	17,30	8,83	2,84	16,65
VB4	1,89	3,58	2,04	2,22	2,37
VB5	9,10	0,10	6,47	4,15	0,12
VB6	7,72	9,88	7,94	11,89	0,31
VB7	4,59	2,05	1,55	1,29	2,30
VB8	3,44	0,00	1,00	0,09	0,00
VB9	2,33	2,47	1,34	4,63	0,11
VB10	6,32	4,97	0,98	6,43	0,39
VB11	1,38	0,76	0,38	1,34	0,32
VB12	0,80	0,00	0,00	0,46	0,00
VB13	4,82	4,77	5,15	6,76	9,67
VB14	3,57	0,54	3,21	5,61	0,15
VB15	4,61	3,90	2,55	8,01	2,53
VB16	4,97	11,38	8,28	5,13	1,29
VB17	2,75	1,17	1,32	4,09	0,12
VB18	3,58	2,18	3,97	3,21	2,65
VB19	1,68	2,21	2,25	0,54	2,44
VB20	5,95	3,72	6,01	4,11	6,87
VB21	4,74	3,29	7,53	2,40	15,15
VB22	8,24	9,75	13,47	11,36	25,99
VB23	4,33	7,25	5,01	0,25	0,80
VB24	0,15	0,89	1,61	0,07	0,24

Tabela A.10. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 RAOA (número 10) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+1260	D+1440	D+1620	D+1800
VB1	0,78	2,10	1,25	4,24	2,49	1,34	2,06	1,33	3,55
VB2	4,99	3,36	0,47	5,09	7,18	0,94	6,15	6,59	1,23
VB3	6,46	3,92	2,40	6,37	9,56	2,23	12,33	8,44	6,05
VB4	2,08	5,82	4,36	1,74	1,41	3,60	4,56	3,23	4,20
VB5	10,26	11,72	18,92	9,28	7,78	2,56	0,17	13,01	2,67
VB6	8,38	27,96	21,50	7,17	9,16	9,91	16,41	8,58	28,82
VB7	3,72	5,72	5,76	5,79	7,98	11,83	4,83	3,73	5,73
VB8	2,54	0,00	0,00	2,30	1,57	1,80	5,79	1,11	2,41
VB9	2,02	0,19	0,07	0,03	1,69	0,10	0,17	0,12	0,14
VB10	4,61	0,24	0,09	0,06	0,59	0,21	0,70	1,31	0,41
VB11	3,25	0,00	0,61	0,96	0,22	1,81	0,00	0,63	0,20
VB12	0,76	0,00	0,00	0,65	0,00	0,48	0,00	0,00	0,00
VB13	7,47	18,57	8,11	5,68	6,97	7,64	0,00	5,27	20,95
VB14	4,24	1,36	2,64	4,69	0,00	8,40	0,00	7,52	0,00
VB15	7,55	0,38	0,10	7,27	9,98	3,09	2,10	5,64	0,21
VB16	6,83	0,39	5,06	6,06	3,32	2,50	0,54	6,62	1,58
VB17	4,17	0,21	0,07	3,76	4,17	0,06	0,09	2,85	0,12
VB18	1,89	5,22	1,88	5,20	0,76	2,17	2,80	2,85	4,20
VB19	0,77	5,49	2,06	0,66	0,81	2,16	2,94	1,48	4,04
VB20	1,82	5,39	2,09	3,48	0,93	2,60	2,98	2,69	3,91
VB21	3,98	0,69	5,44	5,59	9,90	7,64	3,95	5,46	3,01
VB22	7,41	0,77	16,16	9,17	10,74	21,69	27,91	8,70	6,14
VB23	3,41	0,25	0,45	4,25	2,74	4,41	2,97	2,23	0,27
VB24	0,62	0,25	0,51	0,51	0,03	0,84	0,56	0,60	0,16

Tabela A.11. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 RRS (número 11) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1080	D+1260	D+1560	D+1800
VB1	0,50	1,73	2,92	2,73	2,30	3,31	2,76	3,41	3,59	2,81
VB2	5,55	3,53	4,98	5,05	5,94	4,49	0,23	6,07	0,17	0,25
VB3	6,03	7,33	5,47	8,55	5,75	3,23	2,97	6,79	0,85	0,88
VB4	5,58	4,34	5,10	4,80	3,00	3,70	3,91	3,92	5,76	3,69
VB5	6,67	9,62	7,56	10,04	9,82	0,68	1,33	9,01	6,22	0,22
VB6	7,39	4,58	7,21	3,87	9,79	7,62	7,03	14,44	1,29	2,23
VB7	6,33	7,61	6,34	5,26	4,65	4,23	5,25	12,06	5,76	4,11
VB8	2,11	1,82	4,35	1,24	1,09	0,00	0,00	2,58	0,00	0,00
VB9	1,65	0,74	3,08	0,80	0,19	0,34	0,27	0,25	0,17	0,14
VB10	2,41	1,61	0,60	0,04	2,78	0,39	0,28	1,32	0,30	0,22
VB11	3,49	0,95	0,99	0,98	0,47	0,46	0,52	0,40	0,21	0,25
VB12	1,16	1,83	1,39	0,00	1,12	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00
VB13	7,23	8,56	6,22	8,35	4,16	2,50	17,97	6,82	10,73	8,82
VB14	0,68	2,61	3,61	4,50	5,74	1,14	0,38	2,00	2,03	9,07
VB15	8,91	0,55	6,99	6,27	2,79	6,54	0,57	1,97	2,00	3,30
VB16	5,86	7,09	3,33	3,24	0,19	0,30	0,22	0,64	0,97	0,29
VB17	2,19	1,19	0,06	2,32	1,15	0,41	0,30	0,19	0,00	0,00
VB18	7,01	3,53	4,70	6,01	8,53	4,21	4,63	2,98	5,14	4,18
VB19	0,89	1,07	0,76	0,88	1,69	4,32	3,67	2,48	5,49	4,12
VB20	1,30	1,55	3,35	2,73	4,35	4,62	4,01	2,51	7,02	4,24
VB21	3,93	6,75	6,10	8,53	10,07	10,02	26,42	1,95	22,19	2,44
VB22	7,30	10,95	7,48	7,08	13,24	34,96	14,87	14,75	19,11	24,64
VB23	5,08	9,91	6,90	6,51	0,10	0,23	0,23	2,29	0,66	16,75
VB24	0,76	0,52	0,49	0,22	1,09	2,31	1,45	1,17	0,36	7,36

Tabela A.12. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 ALSR (número 12) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1080	D+1620	D+1800
VB1	1,37	1,64	1,77	0,90	0,92	1,77	1,66	2,47	1,07
VB2	5,40	5,37	3,12	8,14	5,26	7,81	9,42	7,37	10,41
VB3	5,32	7,57	7,16	11,57	7,24	10,91	7,00	5,37	8,86
VB4	3,71	1,83	1,83	2,14	2,31	2,44	4,38	3,58	3,42
VB5	8,57	5,28	8,56	4,80	6,41	1,24	6,61	11,56	5,91
VB6	1,22	17,72	11,12	7,93	14,75	1,19	12,70	0,93	10,73
VB7	6,85	7,47	4,39	2,60	2,54	7,27	6,15	5,32	4,13
VB8	1,98	0,00	4,07	0,89	3,71	0,23	0,00	0,10	0,77
VB9	0,57	1,06	0,18	0,26	0,79	1,62	0,19	0,99	0,13
VB10	0,87	0,96	1,65	1,16	1,79	2,00	3,45	0,11	0,13
VB11	3,70	0,24	3,00	0,12	0,94	1,32	0,09	2,47	0,15
VB12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,12	1,53	0,31	0,00
VB13	8,84	7,14	5,80	5,72	6,81	7,67	3,78	4,95	0,83
VB14	6,52	6,09	5,31	6,14	7,06	5,38	5,73	6,66	1,14
VB15	9,34	6,68	8,18	7,55	3,73	4,80	3,55	5,84	7,45
VB16	4,87	1,71	5,41	8,94	4,42	1,58	0,95	8,37	0,07
VB17	1,10	1,52	0,16	0,27	2,24	1,01	1,39	2,44	0,00
VB18	2,37	2,36	2,19	2,41	5,05	2,60	2,81	2,44	2,56
VB19	1,64	1,73	1,17	2,29	1,37	2,54	2,15	1,56	3,08
VB20	2,39	1,87	1,36	2,44	1,61	3,35	2,30	1,54	2,25
VB21	6,45	9,34	6,89	7,09	4,18	8,27	6,66	4,33	1,21
VB22	11,08	11,60	10,64	16,09	12,07	21,05	17,19	15,96	27,35
VB23	5,10	0,19	5,34	0,21	4,12	3,64	0,10	5,23	7,86
VB24	0,72	0,63	0,71	0,35	0,21	0,18	0,19	0,09	0,52

Tabela A.13. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 JFA (número 13) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+1080	D+1440
VB1	0,43	1,40	3,24	5,39	2,21	1,51	2,69
VB2	4,44	4,83	4,87	6,57	3,28	5,72	3,07
VB3	4,87	6,29	0,05	8,02	8,13	9,34	0,00
VB4	1,78	1,00	1,32	1,47	2,65	2,22	3,52
VB5	8,04	6,54	6,75	3,39	11,22	1,48	1,71
VB6	12,10	10,27	11,81	0,50	7,09	13,55	11,22
VB7	3,98	3,66	6,35	1,31	3,47	4,90	4,15
VB8	1,37	3,01	0,00	0,78	0,00	0,48	0,00
VB9	0,26	1,82	1,86	0,36	1,68	0,14	0,25
VB10	2,40	1,93	3,32	0,05	2,93	0,11	0,00
VB11	3,16	0,30	0,14	0,07	0,24	0,15	0,89
VB12	0,79	0,79	0,00	1,35	1,18	1,83	0,00
VB13	4,27	5,58	5,55	6,50	3,47	6,51	10,04
VB14	4,08	4,15	4,46	2,75	4,37	1,80	4,99
VB15	5,25	7,76	7,88	10,59	3,62	5,03	2,58
VB16	5,15	7,01	6,43	8,46	2,29	3,93	6,91
VB17	0,09	0,77	1,51	1,01	3,31	0,20	1,25
VB18	5,51	4,89	5,40	5,34	7,64	3,41	3,71
VB19	1,05	1,00	1,07	1,22	1,65	1,93	3,68
VB20	5,05	1,08	2,04	3,99	4,45	2,76	5,43
VB21	5,71	6,70	6,61	7,35	7,52	6,47	13,32
VB22	12,78	12,19	11,21	15,93	13,76	18,35	19,56
VB23	5,17	4,62	5,50	7,03	0,77	7,46	0,70
VB24	2,26	2,41	2,64	0,57	3,05	0,74	0,33

Tabela A.14. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 MGB (número 14) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+1080	D+1260	D+1440	D+1560	D+1800
VB1	1,15	3,32	3,22	5,63	2,67	2,25	2,47	2,12	2,04
VB2	4,78	4,21	4,52	9,10	6,22	8,26	6,38	0,00	11,06
VB3	6,64	4,71	5,18	8,07	12,03	8,42	12,15	8,60	11,61
VB4	1,48	1,82	1,47	3,01	4,16	2,98	3,57	2,26	1,92
VB5	11,33	7,07	6,52	10,94	6,83	11,85	0,14	1,14	2,37
VB6	5,49	8,09	7,02	13,53	2,17	19,73	0,16	0,71	6,43
VB7	4,48	5,98	7,19	10,64	3,31	2,87	2,86	10,07	2,68
VB8	2,10	2,71	3,43	5,73	0,00	0,00	7,66	0,50	2,47
VB9	0,57	2,17	3,62	4,74	0,20	0,11	0,00	0,00	0,11
VB10	1,93	6,38	4,52	0,00	1,57	1,61	0,26	3,88	5,95
VB11	1,01	2,30	3,82	0,08	0,88	2,06	0,13	6,20	3,44
VB12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VB13	4,63	4,28	1,79	0,00	8,94	4,49	4,58	7,87	4,68
VB14	4,29	3,76	2,77	0,12	3,89	4,37	4,49	3,08	6,50
VB15	7,56	7,45	6,47	5,23	2,24	4,51	5,39	3,90	2,23
VB16	5,19	5,10	6,39	2,04	0,57	5,45	3,73	0,99	13,39
VB17	3,38	1,90	3,41	0,27	1,49	1,13	0,29	3,08	0,08
VB18	4,21	4,40	4,36	1,64	4,43	2,24	2,58	4,08	4,65
VB19	1,18	1,00	0,99	1,75	2,85	1,50	2,47	2,29	2,03
VB20	2,85	2,47	4,23	1,76	3,26	2,94	2,67	2,83	2,36
VB21	7,08	5,12	6,35	1,02	9,82	2,68	4,80	8,75	2,54
VB22	10,26	8,98	6,57	0,16	21,84	7,93	27,96	24,83	9,41
VB23	7,46	6,03	4,81	7,14	0,45	1,52	4,45	2,33	0,78
VB24	0,94	0,74	1,36	7,39	0,16	1,13	0,82	0,51	1,27

Tabela A.15. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 ISJ (número 15) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1080	D+1350	D+1800
VB1	0,88	1,31	1,32	3,31	1,42	4,81	3,69	3,34	3,81
VB2	1,14	3,78	7,76	0,00	3,77	1,23	6,07	0,75	0,45
VB3	8,74	5,33	8,24	1,92	4,54	9,94	1,52	1,59	11,48
VB4	2,10	1,28	1,89	4,78	3,02	6,05	4,62	3,90	4,01
VB5	8,91	9,43	2,88	3,21	16,78	1,70	0,26	3,36	0,37
VB6	12,40	12,53	11,09	6,32	9,48	5,16	6,05	23,42	2,42
VB7	3,75	6,29	2,77	4,45	3,51	7,13	4,53	3,99	8,72
VB8	0,36	2,97	1,20	0,31	0,44	0,00	0,00	0,00	0,65
VB9	0,00	0,16	0,39	0,00	0,12	0,00	0,00	0,18	0,86
VB10	0,00	0,17	0,41	0,24	1,11	1,28	1,09	0,28	0,27
VB11	1,08	0,67	1,76	0,47	0,12	0,42	0,00	0,24	0,17
VB12	0,00	0,00	0,92	0,68	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00
VB13	6,38	3,09	3,61	0,53	7,64	4,30	9,23	2,77	4,59
VB14	0,00	4,47	5,93	7,61	0,53	1,91	7,26	1,63	0,00
VB15	4,69	8,41	6,54	2,71	1,03	2,73	1,52	5,30	1,24
VB16	0,74	7,04	2,68	0,88	1,30	1,58	6,28	0,75	5,28
VB17	0,26	0,37	1,02	0,00	0,84	0,26	0,00	0,25	2,39
VB18	2,06	1,40	1,73	3,29	7,44	5,43	5,21	3,52	4,58
VB19	1,97	1,14	1,27	2,99	2,70	6,20	4,86	4,11	4,12
VB20	1,74	2,19	3,60	3,22	2,81	6,32	4,21	3,22	5,12
VB21	6,22	5,78	8,55	9,69	9,50	0,93	8,27	10,23	17,69
VB22	24,66	13,46	18,85	35,72	17,83	30,81	24,82	21,46	19,91
VB23	9,04	5,78	4,20	0,00	0,95	1,29	0,21	4,60	0,84
VB24	2,89	2,93	1,41	7,68	2,85	0,52	0,29	1,12	1,04

Tabela A.16. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 HFG (número 16) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1190	D+1440	D+1800
VB1	2,09	1,91	1,79	2,10	1,16	1,42	1,77	1,72	0,89
VB2	7,17	6,03	6,02	3,94	2,74	3,15	3,92	4,55	7,16
VB3	5,99	5,38	5,55	7,02	8,91	3,84	4,14	5,75	7,82
VB4	1,87	1,88	1,78	3,21	3,62	1,55	1,98	2,19	3,28
VB5	0,07	9,99	7,47	9,70	10,82	14,29	9,29	10,33	8,05
VB6	11,39	11,14	10,71	9,49	8,64	13,00	17,42	19,39	10,76
VB7	7,62	7,25	3,33	5,79	2,03	1,98	7,69	6,08	3,49
VB8	1,72	1,94	3,05	0,97	0,00	0,83	2,41	1,39	0,00
VB9	0,08	0,87	0,92	0,08	0,26	0,19	0,00	0,00	0,56
VB10	1,72	0,09	3,40	2,29	0,20	1,14	0,00	0,32	6,39
VB11	0,22	0,75	0,89	1,18	0,00	1,19	0,70	0,71	1,11
VB12	0,91	0,18	0,00	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
VB13	6,13	4,61	3,57	5,23	5,32	5,90	8,56	7,87	8,01
VB14	5,94	5,22	3,78	4,15	6,20	8,38	2,42	2,39	5,27
VB15	5,40	6,21	5,55	5,85	6,38	4,58	1,88	3,19	1,01
VB16	8,77	7,44	8,88	4,41	9,63	4,23	0,37	3,41	4,73
VB17	3,85	1,27	3,61	0,59	0,47	0,33	1,37	0,31	0,30
VB18	1,95	3,19	3,63	1,29	2,35	2,12	2,22	3,04	2,74
VB19	1,30	0,93	0,88	1,32	1,56	1,64	2,26	2,19	2,10
VB20	2,96	1,78	3,50	1,34	2,12	3,18	5,06	2,99	2,28
VB21	5,17	5,52	4,96	7,80	2,78	11,39	9,15	3,73	2,61
VB22	11,93	10,10	10,18	15,92	16,71	15,54	16,99	16,93	20,70
VB23	4,70	3,51	4,01	3,03	7,95	0,00	0,00	0,78	0,28
VB24	1,05	2,79	2,55	2,50	0,13	0,11	0,41	0,76	0,26

Tabela A.17. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 RLFS (número 17) pré e pós-TACTH.

Famílias	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1080	D+1260	D+1440	D+1800
VB1	1,33	5,16	1,79	4,28	1,19	4,96	2,43	4,26	3,40
VB2	4,77	7,87	2,71	6,11	3,95	6,94	5,90	0,41	4,25
VB3	3,17	5,56	0,49	5,69	0,43	0,73	0,25	0,83	2,46
VB4	1,73	2,29	2,57	2,00	3,39	2,15	3,12	3,37	3,53
VB5	16,08	3,91	24,64	5,50	12,89	8,92	22,40	0,74	1,04
VB6	12,32	6,25	10,25	8,55	9,48	10,19	7,38	2,35	20,74
VB7	5,17	4,87	2,65	6,46	4,17	6,52	5,15	6,40	4,72
VB8	0,85	0,76	0,76	3,10	0,00	1,83	1,03	0,28	2,31
VB9	0,00	0,80	0,12	3,40	0,91	2,48	1,76	1,25	0,13
VB10	0,15	0,78	0,54	2,17	1,23	2,66	0,59	1,03	0,73
VB11	1,93	0,69	0,97	0,29	1,89	1,29	0,58	0,60	0,22
VB12	0,00	0,62	0,00	0,21	0,00	0,07	0,30	2,24	0,00
VB13	0,96	4,08	0,90	3,39	9,30	5,31	7,78	11,08	9,69
VB14	2,62	8,10	0,40	5,06	8,26	7,01	9,37	9,36	1,72
VB15	1,49	4,86	2,92	6,31	1,10	1,00	4,35	1,21	0,60
VB16	1,11	7,23	1,96	0,00	4,07	4,19	1,83	0,88	4,79
VB17	0,00	4,24	1,06	2,63	3,30	2,58	3,93	0,60	0,11
VB18	3,54	6,79	3,62	7,05	6,70	3,91	7,52	4,90	3,68
VB19	1,83	1,67	2,23	1,34	3,22	2,01	2,91	3,58	2,54
VB20	2,79	3,52	2,62	4,76	3,10	5,07	3,78	3,92	2,39
VB21	8,79	6,33	9,16	2,87	1,04	5,30	3,65	10,49	11,27
VB22	23,13	7,72	26,45	12,24	18,13	10,78	2,80	13,66	18,98
VB23	5,84	5,52	0,64	4,24	1,72	3,24	0,80	16,36	0,59
VB24	0,40	0,37	0,55	2,35	0,54	0,83	0,41	0,24	0,11

Tabela A.18. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 CPS (número 18) pré e pós-TACTH.

Famílias	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1440	D+1800
VB1	1,66	1,64	1,94	1,39	3,51	1,54
VB2	4,81	4,16	3,64	0,00	1,61	2,70
VB3	7,49	5,28	4,72	3,11	2,87	6,86
VB4	2,99	2,57	2,16	2,70	4,16	3,96
VB5	9,71	7,89	6,37	9,94	4,48	12,77
VB6	18,79	11,48	9,60	6,93	0,20	7,56
VB7	4,33	4,42	5,95	3,50	4,59	2,29
VB8	0,00	1,56	1,13	1,34	0,00	0,00
VB9	0,00	0,49	1,03	0,54	0,24	0,11
VB10	0,59	0,91	1,38	1,36	1,02	3,04
VB11	0,93	1,55	4,44	3,42	1,52	0,92
VB12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31
VB13	2,77	5,05	3,46	3,33	5,70	7,41
VB14	0,24	2,35	3,17	4,85	2,42	4,59
VB15	4,57	4,69	5,71	5,62	5,08	5,97
VB16	2,85	2,79	5,94	7,12	4,03	5,31
VB17	0,79	0,57	0,00	2,58	0,31	0,10
VB18	3,29	3,31	6,51	4,01	4,23	2,15
VB19	2,21	1,95	1,27	1,61	4,37	2,12
VB20	3,21	2,84	3,52	2,12	4,48	2,24
VB21	9,39	11,29	7,11	8,04	6,01	6,65
VB22	15,87	19,50	12,13	17,54	37,60	18,42
VB23	2,13	2,10	5,71	6,24	1,23	2,02
VB24	1,39	1,60	3,09	2,70	0,33	0,95

Tabela A.19. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 TDP (número 19) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900
VB1	2,69	3,76	1,77	2,56	2,31	2,99
VB2	1,96	6,66	6,85	0,94	5,23	0,87
VB3	1,40	6,72	1,64	0,50	0,83	0,85
VB4	3,07	1,96	1,74	3,87	3,89	2,66
VB5	12,89	3,02	10,33	5,21	12,10	16,94
VB6	3,54	1,76	12,51	0,34	12,62	0,35
VB7	4,87	6,13	1,62	8,86	4,25	5,50
VB8	0,00	0,59	0,34	0,27	0,00	0,00
VB9	0,15	3,35	0,11	0,00	0,08	0,43
VB10	0,85	4,66	0,24	0,84	1,14	0,35
VB11	1,81	0,60	0,45	0,24	0,33	0,29
VB12	0,00	1,20	0,09	0,50	1,62	0,08
VB13	7,72	5,02	5,11	13,34	8,05	6,13
VB14	1,27	5,84	7,28	4,27	6,95	0,00
VB15	3,11	5,70	6,53	13,60	2,57	3,32
VB16	8,99	6,99	9,00	21,24	4,25	2,92
VB17	0,97	4,34	1,36	1,29	1,46	0,08
VB18	4,72	4,75	1,57	3,96	2,43	3,53
VB19	2,58	1,13	1,43	3,71	2,45	3,17
VB20	3,20	1,26	1,97	4,32	2,24	3,03
VB21	5,44	2,64	6,53	1,59	5,83	17,78
VB22	25,84	14,63	11,67	7,85	18,38	28,05
VB23	2,29	7,01	7,72	0,30	0,92	0,28
VB24	0,64	0,28	2,14	0,43	0,07	0,41

Tabela A.20. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 MQS (número 20) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-TX	D+180	D+540	D+900
VB1	4,35	2,08	1,47	2,72
VB2	3,72	16,90	0,00	0,97
VB3	1,79	8,43	16,71	5,08
VB4	6,41	5,80	7,32	2,94
VB5	0,95	0,12	24,98	0,15
VB6	1,11	0,31	0,23	39,06
VB7	13,15	3,53	5,27	3,73
VB8	0,18	0,00	0,30	0,00
VB9	0,38	0,10	0,00	0,11
VB10	0,28	0,14	0,00	1,31
VB11	0,54	1,03	1,63	0,00
VB12	0,00	0,00	0,00	0,00
VB13	5,17	10,86	1,21	4,89
VB14	0,88	0,10	0,00	0,80
VB15	7,11	6,00	1,03	2,64
VB16	4,28	8,72	1,04	9,09
VB17	1,37	0,20	1,32	1,91
VB18	7,76	2,92	4,47	4,12
VB19	7,20	3,07	4,44	3,17
VB20	6,20	3,13	4,77	2,89
VB21	0,59	4,15	2,77	13,86
VB22	23,84	20,49	20,41	0,15
VB23	2,22	1,73	0,25	0,00
VB24	0,54	0,20	0,40	0,40

Tabela A.21. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 TKF (número 21) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+180	D+360	D+540	D+720	D+900	D+1080	D+1440
VB1	2,54	3,97	0,76	6,46	7,21	5,11	1,42	1,18
VB2	5,63	1,53	5,48	5,70	10,42	5,37	8,63	8,91
VB3	4,69	11,58	6,32	4,73	2,24	0,10	10,82	5,30
VB4	1,53	3,53	2,31	5,36	5,16	2,84	3,13	2,13
VB5	7,23	6,36	10,39	0,23	12,58	8,98	5,84	0,17
VB6	7,91	4,20	14,92	0,29	0,28	16,18	13,78	1,06
VB7	4,39	2,76	3,91	4,74	4,42	4,44	2,35	2,28
VB8	3,10	0,00	0,85	0,00	0,00	0,00	0,41	3,12
VB9	0,95	0,16	0,07	0,24	0,47	0,11	0,07	1,80
VB10	1,98	1,20	2,60	6,01	1,19	1,13	0,64	5,49
VB11	3,13	0,00	4,12	0,40	0,67	0,26	0,08	8,16
VB12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,02	0,00	1,48	1,19
VB13	5,08	0,37	3,81	7,82	0,00	4,61	5,98	4,24
VB14	3,24	0,57	5,53	0,00	7,52	1,98	7,34	7,56
VB15	6,27	2,56	2,88	4,03	8,13	3,24	5,71	10,38
VB16	1,92	1,25	1,00	3,08	12,90	10,83	6,52	11,30
VB17	3,44	0,00	2,68	0,93	3,88	2,36	1,70	4,54
VB18	5,32	7,39	5,24	9,41	3,25	6,39	2,09	3,10
VB19	1,41	3,47	1,79	4,42	3,62	1,87	2,16	1,92
VB20	4,24	3,54	5,16	10,62	4,11	2,50	2,13	3,44
VB21	5,47	21,93	8,37	15,11	5,08	3,54	2,35	1,67
VB22	14,43	23,46	10,98	6,90	1,32	16,24	11,71	9,70
VB23	3,82	0,00	0,40	1,16	2,06	0,90	3,40	1,08
VB24	2,27	0,17	0,43	2,36	2,47	1,01	0,26	0,26

Tabela A.22. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 MSG (número 22) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+840	D+1440
VB1	2,90	0,07	3,97
VB2	7,33	3,67	6,28
VB3	7,83	10,65	10,64
VB4	2,11	3,57	5,33
VB5	3,88	11,06	5,97
VB6	9,43	18,61	17,40
VB7	4,27	6,73	6,33
VB8	1,60	0,00	2,26
VB9	0,11	0,00	0,00
VB10	3,54	3,75	0,90
VB11	0,55	0,64	1,46
VB12	0,49	0,00	0,21
VB13	4,18	9,13	3,95
VB14	5,42	6,70	5,13
VB15	5,01	0,88	3,84
VB16	9,94	0,41	10,73
VB17	2,02	0,00	0,99
VB18	1,64	2,59	2,65
VB19	1,43	1,51	2,60
VB20	1,83	1,91	2,59
VB21	5,28	0,00	0,51
VB22	14,03	17,98	5,00
VB23	3,69	0,07	0,87
VB24	1,52	0,07	0,40

Tabela A.23. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico do paciente com diabetes *mellitus* tipo 1 ECP (número 23) pré e pós-TACTH.

Famílias	Pré-Tx	D+720
VB1	2,55	2,37
VB2	4,08	0,33
VB3	2,68	0,40
VB4	3,32	3,86
VB5	18,57	0,51
VB6	14,55	0,28
VB7	13,94	4,02
VB8	0,19	0,00
VB9	0,00	0,15
VB10	1,93	1,41
VB11	0,09	0,30
VB12	0,00	0,00
VB13	6,44	0,10
VB14	0,60	0,27
VB15	0,55	8,20
VB16	4,93	4,80
VB17	0,00	0,28
VB18	3,10	3,97
VB19	3,24	4,41
VB20	3,82	4,07
VB21	6,35	22,80
VB22	8,60	37,10
VB23	0,20	0,14
VB24	0,27	0,22

Tabela A.24. Frequência das famílias Vβ do TCR em linfócitos T do sangue periférico de indivíduos sadios.

Famílias	Controle 1	Controle 2	Controle 3	Controle 4	Controle 5	Controle 6	Controle 7
VB1	2,39	1,49	4,02	1,55	1,85	3,66	0,89
VB2	7,12	6,26	5,16	4,14	5,46	8,43	6,24
VB3	5,43	0,02	4,69	7,06	8,44	11,95	4,86
VB4	3,41	7,22	1,79	1,74	1,23	1,92	0,85
VB5	9,57	0,03	10,75	13,95	12,33	1,76	4,94
VB6	2,54	0,78	2,53	9,33	5,89	8,68	9,51
VB7	2,74	0,56	5,66	6,80	8,35	0,68	3,24
VB8	0,32	9,26	4,22	3,74	4,68	1,57	4,67
VB9	2,80	7,93	4,13	1,89	2,73	0,12	2,34
VB10	1,40	8,48	0,89	5,06	0,07	0,36	0,67
VB11	2,62	0,57	1,74	0,68	2,89	4,69	0,86
VB12	0,28	6,05	1,95	2,55	0,93	0,17	0,00
VB13	7,80	9,64	6,61	5,81	6,38	6,95	7,74
VB14	7,42	3,26	4,95	4,93	5,12	5,00	1,25
VB15	4,68	9,66	6,68	1,75	4,39	6,43	5,83
VB16	4,82	11,60	8,78	3,33	6,72	3,24	2,16
VB17	6,99	2,17	2,29	1,74	3,82	5,79	4,39
VB18	5,31	1,95	2,79	3,43	1,53	4,29	0,18
VB19	0,10	0,85	0,52	0,37	0,88	0,00	0,00
VB20	0,54	0,78	1,26	0,61	1,98	0,00	0,00
VB21	8,48	1,02	4,42	6,84	4,18	5,79	3,52
VB22	7,17	2,60	8,76	7,43	7,42	16,64	19,69
VB23	6,09	7,78	5,38	5,13	2,44	1,15	13,39
VB24	0,00	0,04	0,02	0,14	0,29	0,74	2,80

APÊNDICE B: Gráficos da distribuição dos fragmentos de CDR3 (**CD em anexo**).

10 Anexos

ANEXO I: Comitê de Ética em Pesquisa

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

www.hcrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO

Ribeirão Preto, 14 de setembro de 2011

Ofício nº 3341/2011
CEP/RCC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DO REPERTÓRIO DE CÉLULAS T EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS* TIPO I SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 332ª Reunião Ordinária realizada em 12/09/2011, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 8063/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-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,

PROF. DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
JÚLIA TEIXEIRA COTTAS DE AZEVEDO
PROF. DR. JÚLIO CÉSAR VOLTARELLI
Depto. de Clínica Médica

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP- Campus Universitário
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO II: Controles (Sangue periférico)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do projeto de pesquisa:

"Avaliação do repertório de células T em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas"

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Kelen Cristina Malmegrim de Farias.

Prezado voluntário,

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor as células-tronco hematopoéticas e mesenquimais, que são as células-tronco (também chamadas de células progenitoras ou células-mãe) da medula óssea (tutano do osso), essenciais para a produção do sangue.

A sua participação é **voluntária.** Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

Porque esta pesquisa esta sendo feita?

Atualmente, pacientes com doenças autoimunes como o diabete melito do tipo 1 e a esclerose múltipla, estão sendo tratados com quimioterapia em altas doses seguida pelo transplante de células-tronco hematopoéticas. O objetivo dessa pesquisa é estudar se as células-tronco hematopoéticas e mesenquimais de pacientes com doenças autoimunes são iguais a de pessoas sadios ou se apresentam problemas genéticos que poderiam alterar suas funções e contribuir para o desenvovimento dessas doenças. Além disso, outro objetivo é estudar o efeito do transplante sobre as características funcionais e genéticas destas células. Caso aceite a participar, suas células do sangue serão utilizadas como controles sadios (normais) em experimentos de nossa pesquisa.

Como será feita esta pesquisa?

Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento, será coletada uma amostra de 6 mL de seu sangue para pesquisa. A coleta de sangue periférico será feita na mesma punção da veia da coleta da bolsa de sangue.

Quais são os riscos que podem ocorrer?

Os riscos que podem ocorrer são a formação de hematomas e sensação dolorosa no local da punção.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para seu processo de doação voluntário de sangue.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a tentar melhorar no futuro o tratamento de pessoas com doenças autoimunes com o transplante de medula óssea.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com a Dra. Kelen Cristina Malmegrim de Farias pelo telefone 21019300 (ramal 9605).

.

Eu, _____, autorizo a retirada de 6 mL de sangue periférico para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a saúde e também que a finalidade dessa pesquisa é de no futuro melhorar o tratamento dos pacientes com doenças autoimunes que são submetidos a transplante de medula óssea.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2013.

_____

Assinatura do doador de sangue – RG

_____

Dra Kelen Cristina Malmegrim de Farias
Pesquisadora responsável