

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área de Fisiopatologia

Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T em camundongos diabéticos induzidos  
por aloxana e estreptozotocina

Luiz Adriano Damasceno de Queiroz

Dissertação para obtenção do título de Mestre  
Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO  
2020

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área de Fisiopatologia

Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T em camundongos diabéticos induzidos  
por aloxana e estreptozotocina

Luiz Adriano Damasceno de Queiroz

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do título de Mestre  
Orientador: Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

SÃO PAULO  
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Q3c Queiroz, Luiz Adriano Damasceno de  
Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos  
T em camundongos diabéticos induzidos por aloxana e  
estreptozotocina / Luiz Adriano Damasceno de  
Queiroz. - São Paulo, 2020.  
98 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas -  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia  
e Toxicologia).  
Orientador: Martins, Joilson de Oliveira

1. Diabetes mellitus. 2. Aloxana. 3.  
Estreptozotocina. 4. Imunologia. I. T. II. Martins,  
Joilson de Oliveira, orientador.

Luiz Adriano Damasceno de Queiroz

Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T em camundongos diabéticos induzidos por aloxana e estreptozotocina

Dissertação para obtenção de título de Mestre.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins  
Orientador/Presidente

Aprovado em

Banca examinadora

José Walber Miranda Costa Cruz

1º. examinador

Marco Aurelio Ramirez Vinolo

2º. examinador

Sandro Rogerio de Almeida

3º. examinador

São Paulo 15 de outubro de 2020

Dedico esse trabalho:

As minhas mães, Alzira Coeli e Median de Pardo, sem as quais não conseguiria essa conquista, pois me educaram nos princípios de amor, respeito, dedicação e compromisso para tudo que eu fizesse, e sempre me incentivaram a acreditar e correr atrás dos meus sonhos, tornando toda jornada até aqui possível.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e professor Dr. Joilson de Oliveira Martins, o qual me deu a oportunidade de fazer parte da sua equipe, e contribuiu imensamente não só na realização desse projeto, como também na minha evolução pessoal e científica, com todo cuidado, paciência, confiança e ensinamentos que me proporcionou nesses dois anos de trabalho que estivemos juntos e fizeram de mim um ser humano melhor do que antes de nos conhecermos.

Ao Prof. Dr. Anderson de Sá-Nunes e sua aluna de doutorado Josiane Betins de Assis, pela produtiva e agradável colaboração que aceitaram fazer nesse projeto. Foram muitos dias de ajuda intensa nos experimentos e aprendizagens em conteúdos de estudos do trabalho que jamais vou esquecer, assim como a boa disposição e recepção que sempre tiveram desde o primeiro contato, quando cederam seu espaço e tempo no laboratório de imunologia experimental do ICB IV.

Ao meu amigo e colega de laboratório João Pedro, que foi a primeira pessoa com quem tive contato na universidade antes mesmo de ingressar no mestrado, durante o curso de férias verão de imunologia, e que desde de então sempre me deu todo suporte e atenção que precisava para me adaptar e desenvolver esse trabalho.

A minha amiga Emanuella Sarmiento, da turma de graduação, que ingressou no mestrado junto comigo para o mesmo laboratório, e me auxiliou em vários momentos tanto nos experimentos do projeto, como na vida pessoal. Meus sinceros agradecimentos.

As minhas amigas da graduação Julia Rezende e Claudia Larissa da Universidade do Estado do Pará do campus de Belém, a qual tive a felicidade de o destino nos unir no mesmo local no mestrado, e a minha amiga conterrânea, Renaira, que tive o prazer de conhecer no programa. E aos meus amigos Vitor Bruno e Vitor Takeuchi! Vocês fizeram minha vida social em São Paulo mais agradável, obrigado!

Aos meus colegas de laboratório Felipe Casagrande, Sabrina de Souza, Thaís Soprani, Leonardo Mendes, e Fernando Henrique, por toda disposição e ensinamentos que me passaram no breve tempo que estivemos juntos no laboratório de imunoendocrinologia.

As técnicas Silene Miglioniri, Fabiana Teixeira do programa de Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) Marlise Monte e Sandra Alexandre do programa de Imunologia do ICB IV por toda ajuda que prestaram sempre que eu precisava, não importava o que fosse. Meus agradecimentos especiais a Silene e a Fabi por facilitar minha vida em muitas ocasiões e ainda serem boas amigas para conversar e dançar!

A equipe do Biotério Silvânia Meiry, Renata Spalutto, Flávia de Moura, Mariléia Oliveira, e Wagner Botelho, pelo trabalho maravilhoso e profissionalismo impecável que prestaram durante todo o momento que estive em contato com eles. Parabéns!

As secretarias do programa Samantha Luiza e Edna Batista, pela assistência prestada e pessoas maravilhosas que são, e em especial a Elaine Midori, a qual considero uma grande amiga que tive a sorte de conhecer na faculdade.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Anália Cirqueira, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, pela colaboração e contribuição em toda parte das análises histológicas desse projeto.

Aos meus irmãos Luiz Stalenmarx, Pérola Marina e João Luiz, por todos momentos de alegria e apoio que sempre me proporcionaram, tornando a minha vida mais fácil e agradável.

As agências de fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – bolsas de Mestrado e PQ-1D), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2017/11540-7), pelo apoio financeiro que prestaram para realização desse projeto.

“I need to be more than that” - Daenerys of the House Targaryen, the First of Her Name, The Unburnt, Queen of the Andals, the Rhoynar and the First Men, Queen of Meereen, Khaleesi of the Great Grass Sea, Protector of the Realm, Lady Regent of the Seven Kingdoms, Breaker of Chains and Mother of Dragons (FIRST...,2014).

## RESUMO

Queiroz, L. A. D. **Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T em camundongos diabéticos induzidos por aloxana e estreptozotocina.** 2020. 98f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A aloxana (ALX) e a estreptozotocina (STZ) são os agentes diabetogênicos mais utilizados na indução do diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) em animais, com vários estudos associando seu uso a efeitos tóxicos na resposta imune. O presente estudo tem como objetivo comparar o fenótipo e a funcionalidade dos linfócitos T em tecidos linfoides e não linfoides de camundongos C57BL/6J normais e diabéticos. Os animais diabéticos (inoculados com ALX ou STZ) e controles não diabéticos (CT) os seguintes parâmetros avaliados: (a) contagem total e diferencial de células da medula óssea e sangue periférico; (b) caracterização da composição de linfócitos em timo, baço e pâncreas, com marcadores de superfície (CD11b, CD3, CD4, CD8, CD19 e CD25); (c) determinação das citocinas fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL12p70 e IL-17 no homogenato de baço e pâncreas; (d) análise morfológica de timo, baço e pâncreas; (e) ativação da resposta adaptativa e produção de imunoglobulinas (IgG)1 e IgG2a em animais imunizados e desafiados com ovalbumina; (f) ativação dos linfócitos T do baço estimulados com concanavalina (ConA). Em relação ao grupo CT, o grupo STZ exibiu aumento nos neutrófilos e redução nos linfócitos na medula óssea. Tanto o grupo ALX quanto o STZ mostraram diminuição nos leucócitos, e aumento nos granulócitos no sangue total. O grupo STZ apresentou diminuição nos linfócitos, T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no timo e linfócitos CD19<sup>+</sup> no pâncreas e no baço. O grupo ALX apresentou aumento do número de linfócitos CD4-CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> no timo. As citocinas IL-1 $\beta$  do baço e IL-6 do pâncreas, do grupo STZ, diminuíram em comparação ao grupo CT. O timo apresentou atrofia da região medular, nos grupos ALX e STZ, com diminuição nas células reticuloepiteliais; morte celular de linfócitos/timócitos; e aumento nos corpúsculos Hassall, no grupo ALX. O pâncreas de ambos os grupos exibiu atrofia das ilhotas de Langerhans e infiltração inflamatória e hiperemia com dilatação vascular. A ativação *in vitro* de linfócitos do grupo STZ foi comprometida. As análises *in vivo* do teste de hipersensibilidade mostraram resposta mais intensa no grupo STZ, com produção semelhante de anticorpos IgG1 e IgG2a nos grupos diabéticos e controle. Embora ambos os agentes diabetogênicos ALX e STZ tenham afetado os órgãos linfoides e suas populações celulares, o impacto disso só se refletiu em alterações no comportamento da resposta imune *in vivo* e *in vitro* de animais tratados com STZ.

Palavras-chave: DM1, ALX, STZ, linfócitos.

## ABSTRACT

Queiroz, L. A. D. **Phenotypic and functional characterization of T lymphocytes of alloxan and streptozotocin induced diabetes.** 2020. 98p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Alloxan (ALX) and streptozotocin (STZ) are the most commonly used diabetogenic agents to induce type 1 diabetes mellitus (DM1) in animals, with several studies associating their use with toxic effects on the immune response. The present study aims to compare the phenotype and functionality of T lymphocytes in lymphoid and non-lymphoid tissues of normal and diabetic C57BL / 6J mice. Diabetic animals (inoculated with ALX or STZ) and non-diabetic controls (CT) evaluated the following parameters: (a) total and differential count of bone marrow cells and peripheral blood; (b) characterization of the lymphocyte composition in the thymus, spleen and pancreas, with surface markers (CD11b, CD3, CD4, CD8, CD19 and CD25); (c) determination of cytokines tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , interferon (IFN)  $\gamma$ , interleukin (IL)  $1\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL12p70 and IL-17 in the spleen and pancreas homogenate; (d) morphological analysis of the thymus, spleen and pancreas; (e) activation of the adaptive response and production of immunoglobulins (IgG) 1 and IgG2a in animals immunized and challenged with ovalbumin; (f) activation of spleen T lymphocytes stimulated with concanavalin (ConA). In relation to the CT group, the STZ group exhibited an increase in neutrophils and a reduction in lymphocytes in the bone marrow. Both the ALX and STZ groups showed a decrease in leukocytes and an increase in granulocytes in whole blood. The STZ group showed a decrease in T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes in the thymus and CD19<sup>+</sup> lymphocytes in the pancreas and spleen. The ALX group showed an increase in the number of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocytes in the thymus. The cytokines IL-1 $\beta$  of the spleen and IL-6 of the pancreas, in the STZ group, decreased compared to the CT group. The thymus presented atrophy of the medullary region, in the ALX and STZ groups, with a decrease in reticuloepithelial cells; cell death of lymphocytes / thymocytes; and increase in Hassall corpuscles, in the ALX group. The pancreas of both groups exhibited atrophy of the islets of Langerhans and inflammatory infiltration and hyperemia with vasculardilation. The *in vitro* activation of STZ group lymphocytes was compromised. *In vivo* analyzes of the hypersensitivity test showed a more intense response in the STZ group, with similar production of IgG1 and IgG2a antibodies in the diabetic and control groups. Although both the diabetogenic agents ALX and STZ affected the lymphoid organs and their cell populations, the impact of this was only reflected in changes in the behavior of the immune response *in vivo* and *in vitro* of animals treated with STZ.

Keywords: Diabetes mellitus, ALX, STZ, lymphocytes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução do número de casos diagnosticados de DM no mundo entre 2000 e 2019 e projeção epidemiológica até 2045 .....	20
Figura 2 – Resposta autoimune DM1 .....	22
Figura 3 – Mecanismo de ação dos agentes diabetogênicos ALX e STZ .....	24
Figura 4 – Modelos de indução DM1 para ALX e STZ .....	25
Figura 5 – Papel dos perfis Th1 e Th17 no desenvolvimento do DM1 .....	27
Figura 6 – Protocolo de indução DM1 por ALX e STZ .....	34
Figura 7 – Delineamento experimental .....	35
Figura 8 – Protocolo de imunização por OVA e indução do DM1 por ALX e STZ.....	40
Figura 9 – Avaliação da glicemia e peso .....	43
Figura 10 – Valores da série eritrocitária .....	44
Figura 11 – Valores da série leucocitária .....	45
Figura 12 – Valores da série plaquetária .....	46
Figura 13 – Marcadores inflamatórios.....	47
Figura 14 – Citocinas no baço .....	48
Figura 15 – Citocinas no pâncreas.....	49
Figura 16 – Capacidade proliferativa de linfócitos.....	50
Figura 17 – Alterações histológicas do timo .....	50
Figura 18 – Atrofia da região medular do timo em animais diabéticos.....	51
Figura 19 – Integridade estrutural do baço em animais controle e diabéticos.....	52
Figura 20 – Alterações histológicas do pâncreas.....	53
Figura 21 – Atrofia das ilhotas de Langerhans no pâncreas de animais diabéticos.....	53
Figura 22 – Imunofenotipagem da população dos linfócitos do timo .....	54
Figura 23 – Populações de linfócitos do baço .....	55
Figura 24 – Populações de linfócitos do pâncreas.....	55
Figura 25 – Cinética da resposta imunológica <i>in vivo</i> contra OVA .....	56

Figura 26 – Avaliação da capacidade proliferativa de linfócitos em animais imunizados com OVA 57

Figura 27 – Anticorpos anti-Ig1 e anti-IgG2a OVA-específicos .....577

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Epidemiologia do DM1 no mundo em 2019 .....	20
Tabela 2 – Anticorpos utilizados para imunofenotipagem dos linfócitos por FACS .....	37
Tabela 3 – Parâmetros hematimétricos.....	46
Tabela 4 – Parâmetros hematimétricos medula óssea .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

a.C	Antes de Cristo
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
anti-GAD65	antidescarboxilase do ácido glutâmico
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ALX	Aloxana
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
ConA	Concanavalina A
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
CT	Controle
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> do tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> do tipo 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
D.O	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EPM	Erro padrão da média
FasL	Ligante de Fas
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GLUT2	<i>Glucose transporter 2</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
IAA	<i>Islet cell antibody</i>
ICA	<i>Anti-insulin autoantibody</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN	<i>Interferon</i>

IL	Interleucina
i.p	Intraperitoneal
i.v	Intravenosa
Na <sub>2</sub> -EDTA	<i>Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovalbumina
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNL	Razão Neutrófilo/Linfócito
RNP	Razão Neutrófilo/Plaqueta
ROS	Espécies reativas do oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
Séc	Século
STZ	Estreptozotocina
Th	<i>T helper (T auxiliar)</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T regulador
USP	Universidade de São Paulo
Znt8	Antitransportador de zinco 8

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1 Considerações gerais sobre o diabetes <i>mellitus</i> .....	19
1.2 DM1 natural e induzido quimicamente por aloxana (ALX) e estreptozotocina (STZ) 21	
1.3 Efeitos toxicológicos de ALX e STZ.....	24
1.4 Resposta imune no DM1.....	26
2. OBJETIVO.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1 Aspectos Éticos.....	33
3.2 Modelo experimental .....	33
3.3 Delineamento experimental .....	33
3.4 Dosagem sérica de glicose .....	34
3.5 Coleta das amostras biológicas .....	35
3.6 Avaliação dos índices hematimétricos.....	36
3.7 Contagens total e diferencial dos leucócitos .....	36
3.8 Imunofenotipagem dos linfócitos nos tecidos por citometria de fluxo.....	37
3.9 Avaliação da ativação dos linfócitos <i>in vitro</i> .....	38
3.10 Dosagem de citocinas e anticorpos IgG1 e IgG2a por ELISA .....	38
3.11 Avaliação da ativação da resposta imune adaptativa <i>in vivo</i> .....	39
3.12 Histopatologia .....	41
3.13 Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1 Caracterização dos modelos.....	43
4.2 Avaliações hematimétricas .....	44
4.3 Análise de citocinas no homogenato de baço e pâncreas.....	48
4.4 Avaliação da capacidade proliferativa dos linfócitos <i>in vitro</i> .....	49
4.5 Avaliação histológica do timo, do baço e do pâncreas .....	50

4.6	Avaliação da população de linfócitos T e B presentes em timo, baço e pâncreas .....	53
4.7	Avaliação da resposta imune adaptativa <i>in vivo</i> .....	56
4.7.1	Avaliação da capacidade proliferativa dos linfócitos <i>in vitro</i> em animais imunizados .....	56
4.7.2	Avaliação da produção de anticorpos específicos OVA em animais imunizados .....	57
5.	DISCUSSÃO.....	59
6.	CONCLUSÃO .....	66
	REFERÊNCIAS .....	68
	ANEXO I.....	77
	ANEXO II .....	79
	ANEXO III .....	83
	Apêndices .....	86

# **INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações gerais sobre o diabetes *mellitus*

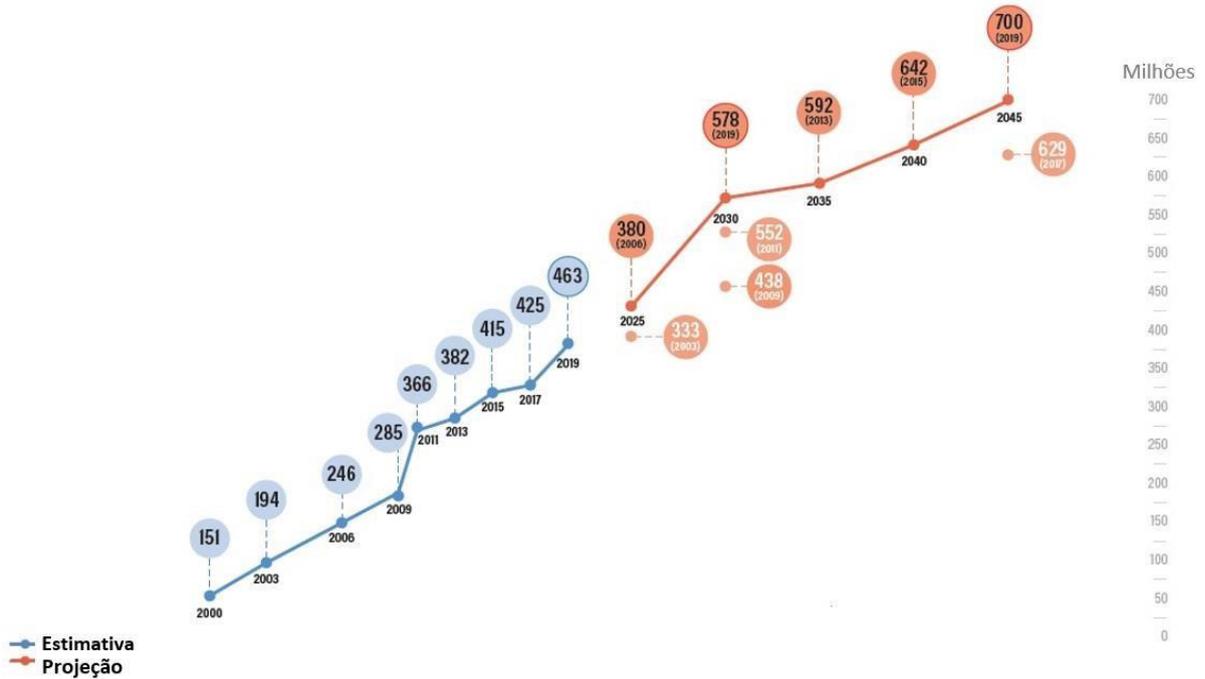
O diabetes *mellitus* (DM) é uma das doenças mais antigas registradas pelo homem, sendo descrita em manuscritos egípcios que datam de 1500 anos a.C. e com tratamentos conhecidos desde o século XIX, como a restrição alimentar e os exercícios propostos por Apollinaire Bouchardat (KARAMANOU et al., 2016; PIERO, 2015; RITU, 2013). A primeira descrição completa sobre a doença foi realizada pelo médico Aretaeus Capadócio, que cunhou termo diabetes (do grego “sifão”) em referência ao volume de evasão de urina do paciente (BARNETT, 2018; RITU, 2013), posteriormente, o termo *mellitus* (do latim “doce como mel”) foi acrescentado por John Rollo, em referência ao sabor adocicado da urina desses pacientes. Desde a descoberta do papel do pâncreas no DM, com a ausência de insulina endógena (MINKOWSKI, 1967; SHARPEY-SCHÄFER, 1913), e tratamento com insulina exógena (BANTING et al., 1922), muito se avançou na qualidade de vida dos pacientes com DM (BARNETT, 2018; PIERO, 2015; RITU, 2013).

O DM é um distúrbio endócrino crônico, caracterizado pelo nível elevado e persistente de glicose no sangue, denominado hiperglicemia, que acontece devido à produção insuficiente de insulina pelo pâncreas, seja pela destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas ou pela atuação ineficaz desse hormônio nos tecidos (DESHMUKH; JAIN, 2015; DEEPTHI et al., 2017; SBD, 2020; SILVA et al., 2014).

Dependendo do mecanismo de ação exercido no organismo, o DM pode ser classificado como DM tipo 1 A (DM1 A), decorrente da destruição autoimune das células do pâncreas; o DM1 B, ou idiopático, devido à natureza idiopática da deficiência da insulina; o DM tipo 2 (DM2), causado pela combinação de resistência à insulina e resposta secretora compensatória inadequada do hormônio; e o DM gestacional, ocasionado em algumas mulheres durante a gravidez, devido à intolerância a carboidratos iniciada durante a gestação (CARVALHO et al., 2016; GAGLIA et al., 2015; SBD, 2020).

Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF) (2019), em 2019, havia 463 milhões de casos registrados de DM em indivíduos entre 20 e 79 anos no mundo (Figura 1), sendo 87 a 91% dos casos totais de DM diagnosticado como DM2, e 7 a 12% como DM1, afetando mais comumente pessoas de menor faixa etária. No Brasil, o DM1 já atinge 51,5 mil pessoas, o que lhe confere o terceiro lugar em prevalência de diabetes desse tipo no mundo (Tabela 1).

Figura 1 – Evolução do número de casos diagnosticados de DM no mundo entre 2000 e 2019 e projeção epidemiológica até 2045.



(Fonte: IDF, 2019)

Tabela 1 – Incidência e prevalência do DM1 no mundo em 2019

Rank	País	Numero de incidência (0-14) em milhares	Rank	País	Numero de prevalência (0-14) em milhares
1	Índia	15,9	1	Índia	95,6
2	EUA	14,7	2	EUA	94,2
3	Brasil	7,3	3	Brasil	51,5
4	China	4,8	4	China	28,7
5	Reino unido	3,5	5	Rússia	21,6
6	Rússia	3,2	6	Reino unido	21,2
7	Argélia	3,1	7	Argélia	20,1
8	Alemanha	2,6	8	Alemanha	17,2
9	Arábia saudita	2,5	9	Marrocos	16,4
10	Marrocos	2,4	10	México	14,8

O Brasil figura como o terceiro país do mundo com maior número de casos de DM1. (Fonte: adaptado de IDF, 2019).

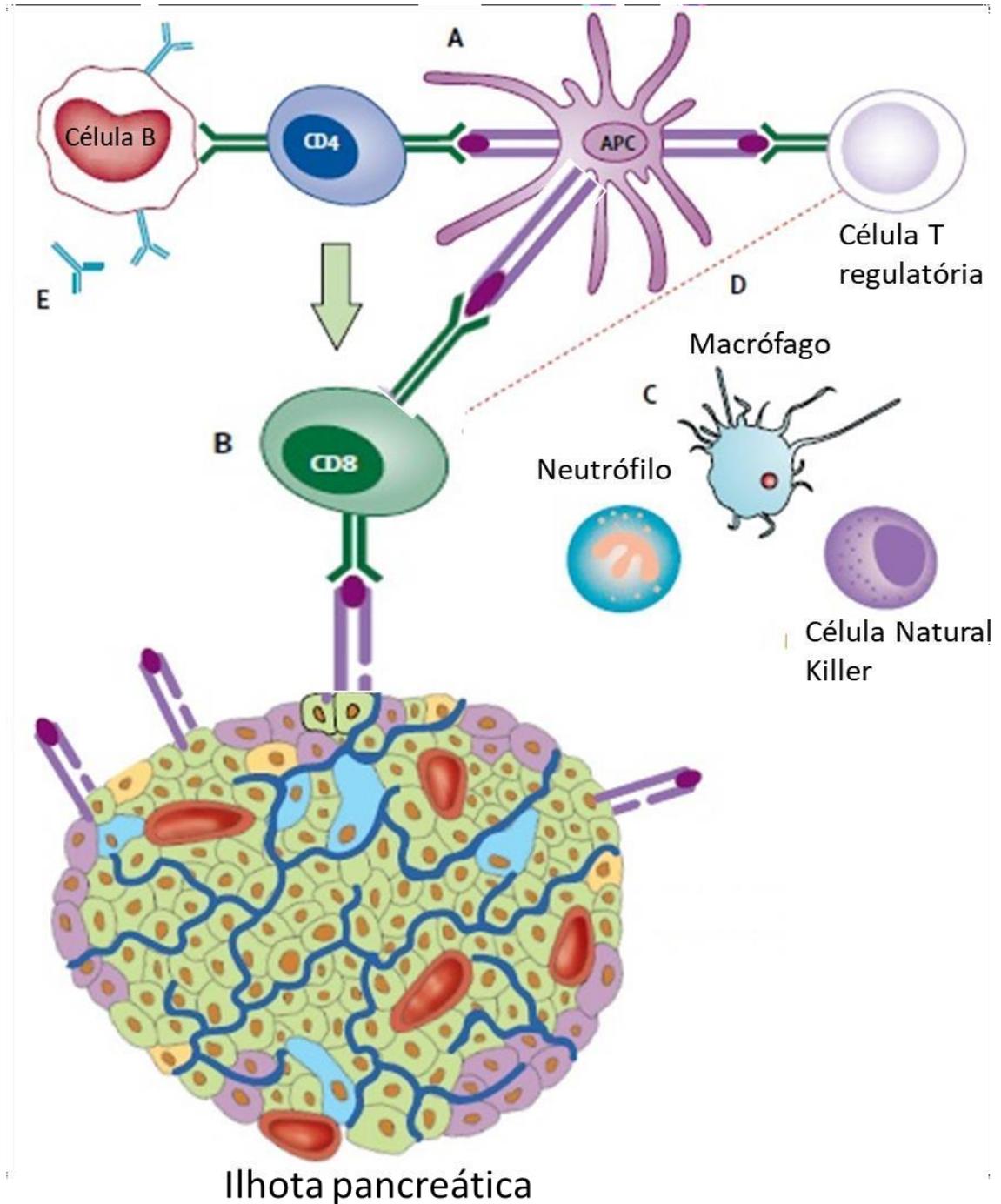
Os critérios para o diagnóstico do DM, adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), consistem nos exames de aferição da glicose em jejum do sangue periférico, após 8 horas de jejum calórico, com resultados de valores diagnósticos acima de 126 mg/dL; na aplicação da prova de tolerância à glicose oral (TOTG), feita a partir da ingestão de 75 g de glicose dissolvida em água, seguida da coleta de sangue para determinação da glicemia, sendo que, 2 horas após, coleta-se outra amostra da sobrecarga oral, com valores de diagnóstico >200 mg/dL; no exame de hemoglobina glicada (HbA1c), que consegue medir os níveis de glicose dos últimos 3-4 meses sem sofrer com a oscilação do dia a dia e independentemente do estado de jejum, com valores de diagnósticos >6,5% (SBD, 2020).

Os indivíduos portadores de DM, que não controlam sua hiperglicemia, sofrem de uma série de complicações com o passar dos anos, tanto de caráter macrovascular (como doença cardiovascular e acidente vascular cerebral) quanto microvascular (como neuropatia, retinopatia e nefropatia) e, em alguns casos, até mesmo as duas formas (como no pé diabético). Desse modo, as complicações geradas por essa doença são divididas em dois grupos distintos: o de complicações agudas metabólicas, que incluem hipoglicemia, cetoacidose e hiperosmolar não cetônico, e o de complicações tardias sistêmicas, observado em nefropatia, neuropatia, retinopatia, microangiopatia e aterosclerose (ASMAT et al., 2016; DATTATREYA; SARANGI, 2015; DESHMUKH; JAIN, 2015; IDF, 2019; PIERO, 2015).

### **1.2 DM1 natural e induzido quimicamente por aloxana (ALX) e estreptozotocina (STZ)**

A destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas, em um processo fisiopatológico inflamatório mediado por células T e B, leva ao desenvolvimento de DM1 (Figura 2), dando origem a um quadro denominado de insulite, detectável pelo aumento elevado de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias no soro do paciente (CORREA et al., 2015; KHARROUBI; DARWISH, 2015; PUGLIESE, 2017). Embora as causas desse processodestrutivo ainda não estejam completamente elucidadas, sabe-se que ele pode aparecer em qualquer idade e está relacionado a uma série de fatores, que incluem a susceptibilidade genética e as condições ambientais, como infecção viral, toxinas e elementos da dieta (KHARROUBI; DARWISH, 2015; SBD, 2020).

Figura 2 – Resposta autoimune DM1



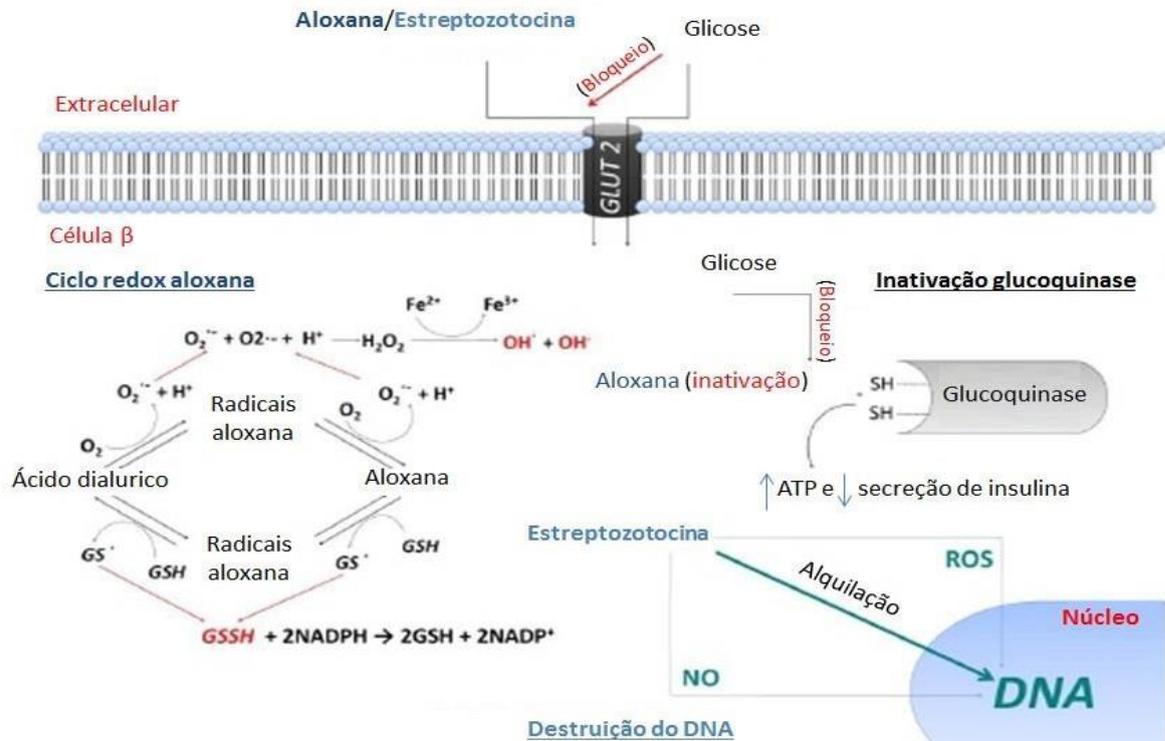
A) O desenvolvimento do DM1 é iniciado através da exposição de antígenos da célula  $\beta$  para as células apresentadoras de antígenos (APC) no pâncreas, que são ativadas e migram para os linfonodos, onde interagem com os linfócitos T  $CD4^+$  autorreativos, os quais, por sua vez, intensificam a atividade dos linfócitos T  $CD8^+$ . B) os linfócitos T  $CD8^+$  ativados retornam para o pâncreas e lisam as células  $\beta$ . C) a destruição das células  $\beta$  é exacerbada pelo ambiente inflamatório criado por células da imunidade inata (macrófagos, neutrófilos, e células *natural killer*). D) esse processo é amplificado por falha na efetividade dos linfócitos T regulatória em suprimir a autoimunidade. E) As células T ativadas nos linfonodos pancreáticos estimulam as células B a produzirem autoanticorpos contra proteínas das células  $\beta$  (Fonte: adaptado de Dimeglio et al., 2018).

O DM1 pode ser mimetizado em laboratório por meio animais de experimentação, com os agentes diabetogênicos ALX (2,4,5,6-Tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) e a STZ (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea)-D-glucopiranosose), os mais comumente utilizados para indução da doença. Ambos os fármacos são análogos à glicose e compartilham o mesmo mecanismo de seletividade para células  $\beta$  do pâncreas, levando à destruição dessas células e induzindo um quadro clínico de DM1 quando causam a destruição de mais de 90% dessas células (LENZEN et al., 2008; SILVA; NOGUEIRA, 2015). Estudos com DM1 induzido quimicamente têm sido amplamente realizados para fins terapêuticos e preventivos, a fim de compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos (e as complicações) gerados pela doença (SILVA; NOGUEIRA, 2015).

A ALX é uma molécula hidrofílica muito instável, transportada para o citosol da célula pelo receptor de glicose GLUT2, presente na membrana plasmática das células  $\beta$ , onde inibe o sensor de glicose glucoquinase (hexoquinase IV), levando à inibição seletiva da secreção de insulina (LENZEN et al., 2008; ROHILLA; ALI, 2012; SILVA; NOGUEIRA, 2015). Logo após sua inoculação, a ALX é rapidamente absorvida e o organismo passa por uma fase rápida de estimulação de liberação de insulina, que dura de 1 a 2 minutos, causada pela capacidade do fármaco de despolarizar a membrana da célula, abrindo os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem e aumentando o influxo desse íon para o interior da célula  $\beta$ , onde o acúmulo de concentrações exageradas leva à liberação suprafisiológica de insulina e de espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas pela reação cíclica da ALX com seu produto redutor, o ácido dialúrico. Essas condições levam à toxicidade das células  $\beta$  pancreáticas e, conseqüentemente, à necrose (Figura 3) (CHEN et al., 2015; LENZEN et al., 2008; SILVA; NOGUEIRA, 2015).

A STZ é um antibiótico diabetogênico isolado da bactéria *Streptomyces achromogenes* (FURMAN, 2015), que se apresenta como uma molécula de glicosídeo nitrosourea natural (N-metil-N-nitrosourea) lipofílica e análoga à nitrosourea animal. Possui absorção seletiva para as células  $\beta$  do pâncreas, através dos receptores GLUT2 (LENZEN et al., 2008; WU et al., 2015), onde acredita-se que a transferência do grupo metil da STZ para o DNA cause uma série de danos, resultando na fragmentação do material genético da célula. A poli-ADP ribose sintetase é então ativada, na tentativa de reparar DNA danificado, levando à diminuição de  $\text{NAD}^+$  e ATP, que induz a célula à necrose após o esgotamento das reservas energéticas celulares. Somado a isso, supõe-se que parte do efeito diabetogênico da STZ também resulte do seu potencial como doador intracelular de óxido nítrico (NO) (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismo de ação dos agentes diabetogênicos ALX e STZ

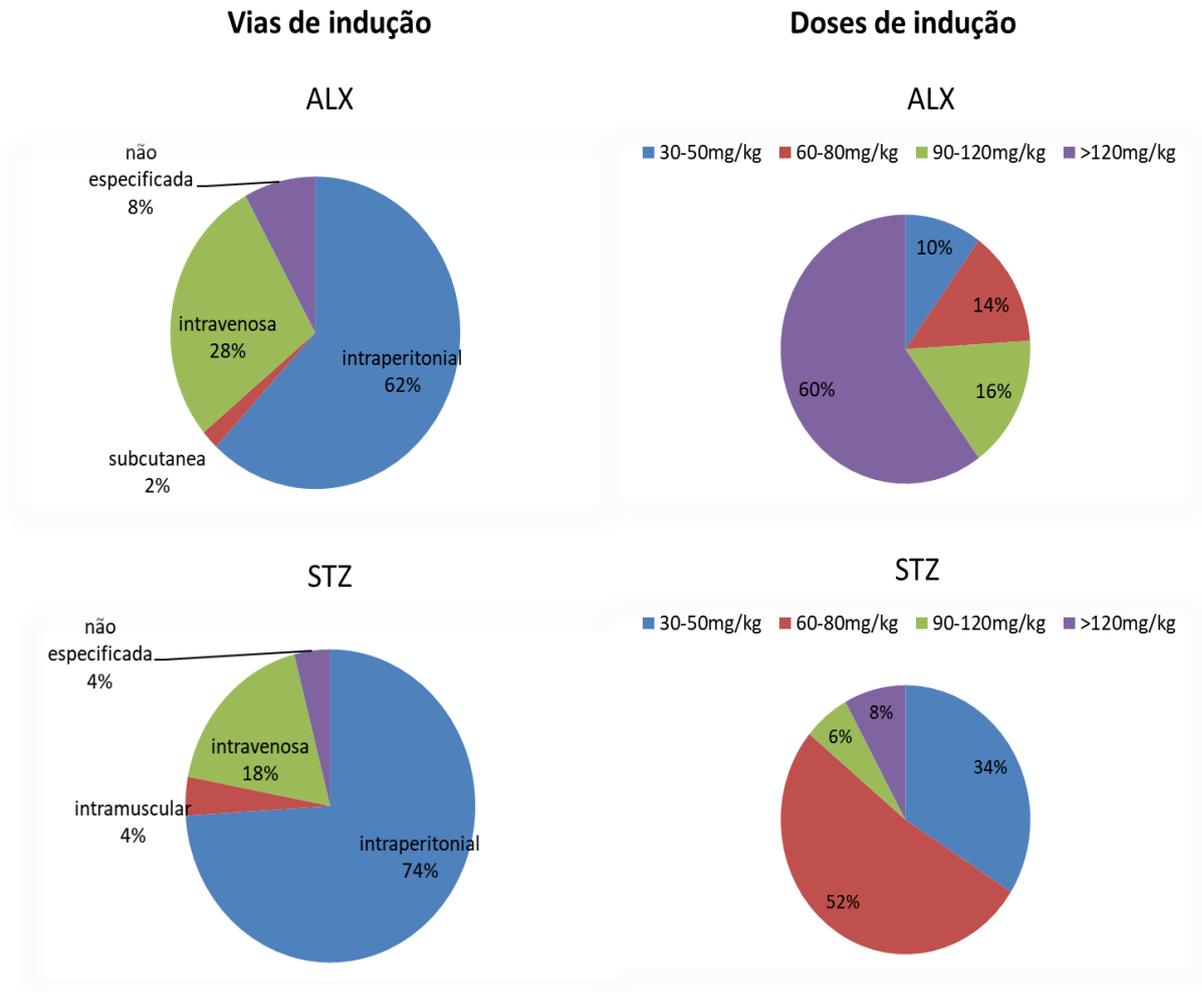


Ambos os agentes diabetogênicos apresentam estrutura análoga à molécula da glicose, conferindo seletividade para a célula  $\beta$  através do receptor GLUT2. O ALX inibe a secreção de insulina por inibição seletiva do sensor de glicose glucoquinase da célula  $\beta$ , aumentando a oferta de ATP para a célula e diminuindo a secreção de insulina. O ciclo redox da ALX gera radicais livres que causam a toxicidade e a morte da célula  $\beta$  por necrose. A STZ causa a destruição do material genético das células  $\beta$ , pela alquilação do DNA ao transferir seu grupo metil para a molécula, levando à fragmentação do material genético, que, na tentativa de reparar os danos causados, leva à ativação exacerbada da poli-ADP ribose sintetase, esgotando as reservas energéticas da célula e levando à morte celular por necrose. Acredita-se que a formação de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) também participe do efeito tóxico da STZ na destruição das células  $\beta$  (Fonte RADENKOVIĆ et al., 2016).

### 1.3 Efeitos toxicológicos de ALX e STZ

Ambos os agentes ALX e STZ apresentam efeitos toxicológicos diversos, dependentes da dose e da via de administração escolhida para condução de modelos diabéticos experimentais. Em pequenas doses, tanto ALX quanto STZ são instáveis, o que diminui a eficácia da indução; porém, em altas doses a taxa de mortalidade dos animais aumenta de forma significativa (MOSTAFAVINIA et al., 2016). Portanto, a escolha da dose e da rota de administração dos agentes é muito importante para assegurar o êxito da indução, com menor impacto toxicológico para o animal. Embora não haja um consenso sobre esses dados na literatura, observou-se quais doses e vias são mais empregadas em estudos com esses modelos diabéticos, conforme a Figura 4.

Figura 4 – Modelos de indução DM1 para ALX e STZ



Fonte: Próprio autor. Levantamento bibliográfico de 100 artigos (50 ALX e 50 STZ), realizado na base de dados do PubMed, no período entre 2000 e 2018, para identificação dos principais protocolos de indução de DM1 por ALX e STZ em modelos experimentais de roedores.

Em um levantamento bibliográfico realizado por Muller et al. (2011), de 131 artigos analisados sobre transplante de ilhotas murinas, 76,3% (100) usaram o modelo de STZ, contra 3,8% (5) de ALX. De fato, a STZ é preferível para indução de DM1 por apresentar meia vida mais longa, com hiperglicemia prolongada e menor mortalidade (ISLAM; CODE, 2017; DIAB et al., 2015;). Além disso, ao contrário da ALX, a imunotoxicidade da STZ é bem conhecida, com efeitos diretos nos linfócitos, como a menor proliferação de células T isoladas do baço de ratos (MULLER et al., 2011; SAKOWICZ-BURKIEWICZ et al., 2006); diminuição da população de células T CD8<sup>+</sup> no sangue e aumento de células T reguladoras (Treg) no sangue e órgãos linfoides, linfopenia no baço e sangue (MULLER et al., 2011); atrofia do timo (BROWN et al., 1977; CHATAMRA et al., 1985; OZERKAN et al., 2014); e toxicidade em células da medula óssea (NICHOLS et al., 1981; VIKRAM, A. et al., 2007), o

que leva a alterações das células sanguíneas, como diminuição de HGB (anemia) e neutrofilia (YAKHCHALIAN et al., 2018).

Um estudo conduzido por Gaulton et al. (1985), na década de 1980, mostrou, de forma comparativa, a toxicidade entre a ALX e a STZ nas células imunes *in vivo* e *in vitro*, constatando maior prejuízo do agente STZ para os linfócitos, mesmo quando administrada em doses abaixo do necessário para o estabelecimento do DM1. No caso da ALX, não houve toxicidade para as células linfoides mesmo em doses acima de dez vezes o necessário para indução da doença. Trinta anos depois, Diab et al. (2015) conduziu estudo semelhante, para avaliação da citotoxicidade de ambos os agentes, encontrando alterações *in vitro* nas células da linhagem sanguínea, redução de esplenócitos e efeito imunossupressor no transplante de enxertos de camundongos, causados pela STZ quando comparada aos animais tratados com ALX.

Uma forma de reduzir a toxicidade da STZ no animal é empregando-se baixas múltiplas doses de cinco vezes, conforme proposto por Like e Rossini (1976), o que apenas danifica parcialmente as ilhotas pancreáticas, levando a um processo inflamatório, permitindo que as células T tenham acesso a antígenos das ilhotas, assemelhando-se mais à patogênese do DM1 A (BROWN et al., 1977; FURMAN, 2015). De maneira semelhante, Federiuk et al. (2004) tentaram encontrar uma via ideal de administração da ALX, para reduzir a toxicidade e a mortalidade dos ratos, e chegaram à conclusão de que uma única superdose por via intraperitoneal (200mg/ kg) seria a mais efetiva, com 70% de incidência do DM1 e 10% de mortalidade. Apesar de haver muitos estudos sobre a ALX e a STZ, poucos são os que tratam sobre seus efeitos imunotoxicológicos e, desses, a maioria aborda apenas a STZ, o que torna a análise comparativa de ambos um tanto escassa, deixando lacunas a serem investigadas, para entender melhor os efeitos na resposta imune decorrentes do uso de ALX ou STZ.

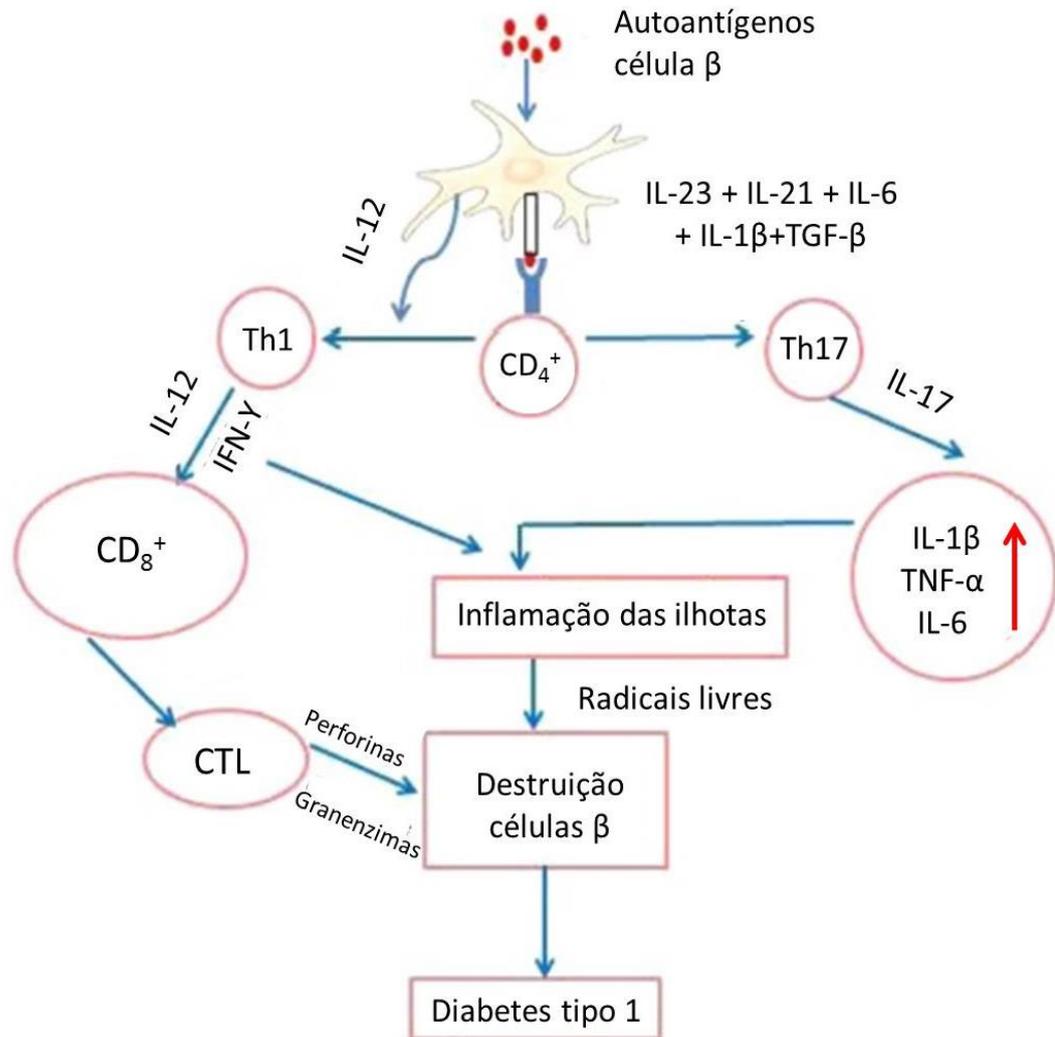
#### **1.4 Resposta imune no DM1**

A patogênese do DM1 se caracteriza pela ativação anormal de vários tipos de células do sistema imune, pela ação das citocinas, que agem sobre a diferenciação, o crescimento, a motilidade e/ou as funções das células-alvo, sobretudo dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (ABDELMONEIM et al., 2018; ALNEK et al., 2015; NUNES, 2017).

A ativação das células T CD4<sup>+</sup> ocorre pelo contato do autoantígeno mediado pelas APC, como os macrófagos e as células dendríticas, e, dependendo do padrão de citocinas expresso pela célula T CD4<sup>+</sup>, ela pode assumir os perfis Th1 (produtores de IFN- $\gamma$ ), Th2 (produtores de

IL-4, IL-5 e IL-13), Th17 (produtores de IL-17) ou Treg (produtores de IL-10 e TGF- $\beta$ ), dos quais os perfis Th1 e Th17 predominam no DM1 (Figura 5), com uma resposta do tipo celular, com infiltrado rico em neutrófilos polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos (ALNEK et al., 2015; NUNES, 2017; SZABLEWSKI, 2014).

Figura 5 – Papel dos perfis Th1 e Th17 no desenvolvimento do DM1



A apresentação dos autoantígenos das células  $\beta$  pelas células APC aos linfócitos T  $CD_4^+$  estimula a diferenciação de células T efectoras em perfil Th1 ou Th17 baseado de acordo com o microambiente de citocinas. A IL-12 produzida pelas células APC ativam as células Th1, que secretam IL-12 para a ativação das células T  $CD_8^+$  (Pré-CTL) a se tornarem linfócitos T citotóxicos (CTL). O IFN- $\gamma$  secretado pelas células Th1 representa um papel-chave na destruição das células  $\beta$ , bem como na ativação dos CTL, os quais, por sua vez, liberam granzimas e perforinas para destruição das células  $\beta$  por apoptose. Simultaneamente, a IL-23 aumenta a diferenciação das células do perfil Th17. A produção da IL-17 por esse perfil leva então a um enriquecimento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ , quimiocinas, e na produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), causando aumento dos radicais livres e induzindo a destruição das células  $\beta$  (Fonte: ABDELMONEIM et al., 2018).

Em um estudo realizado por Sakaguchi et al. (2013), foi proposto que o processo autoimune do DM1 possa resultar de uma falha no desenvolvimento e/ou na manutenção da tolerância imunológica a autoantígenos expressos pelas células  $\beta$ , que ocorre em alguma das quatro vias de tolerância [seleção negativa no timo, ignorância imunológica, anergia, expressão do fator de transcrição *Forkhead box P3* (Foxp3) nos linfócitos Treg do timo e do sistema periférico].

As células Treg são linfócitos envolvidos no controle da resposta imune, responsáveis principalmente pela supressão das células T autorreativas e pela indução da tolerância imunológica no DM1 (ROEP; TREE, 2014; SOUSA et al., 2016; TAN et al., 2014). Kuhn et al (2016) chegaram à conclusão, em seus estudos, de que a ausência de células Treg tímicas e o desequilíbrio do perfil Th1/Th2 são responsáveis pela aceleração da doença em camundongos diabéticos não obesos (NOD).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> atuam com as células T CD4<sup>+</sup> e com os macrófagos na destruição das células  $\beta$ , através da liberação de moléculas de perforina e granzima ou por interações dependentes de Fas e seu ligante (FasL) (BURRACK et al., 2017; SOUSA et al., 2016; VAN-BELLE et al., 2011). Durante esse processo, ambos os linfócitos T e os macrófagos produzem e secretam citocinas pró-inflamatórias, criando um ambiente deletério para células  $\beta$  (BURRACK et al., 2017).

A produção de anticorpos e autoanticorpos pelos linfócitos B representa um fator determinante para o DM1, podendo ser usado como marcador para a doença em indivíduos recém-diagnosticados e para aqueles que ainda irão desenvolvê-la (NUNES, 2017; SZABLEWSKI, 2014). Várias moléculas foram reconhecidas como marcadores, nos últimos anos, e incluem o anticorpo antitransportador de zinco (Znt8), o anticorpo anti-ilhota (ICA), o anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD65), o autoanticorpo anti-insulina (IAA), o anticorpo antitirosina-fosfatase IA-2 e IA-2B, a proteína relacionada à subunidade catalítica de glicose-6-fosfatase específica de ilhotas (IGRP), a cromogranina A e seus peptídeos, o polipeptídeo amiloide de ilhéus (IAPP), os antígenos leucocitários humanos DR3 e DR4, dentre outros (PUGLIESE, 2017; SBD, 2020; SOUSA et al., 2016).

Portanto, considerando a importância da resposta imune para o estudo do DM1 e a preferência do agente diabetogênico STZ para indução do DM1 químico, mesmo com vários efeitos tóxicos descritos para linfócitos, baço, timo e medula óssea (BROWN et al., 1977; CHATAMRA et al., 1985; GAULTON et al., 1985; MULLER et al., 2011; NICHOLS et al., 1978; NICHOLS et 1981; OZERKAN et al., 2014; SAKOWICZ-BURKIEWICZ et al., 2006; VIKRAM, A. et al., 2007; WELLHAUSEN, 1986; YAKHCHALIAN et al., 2018), contra a

aparente menor toxicidade do agente ALX (DIAB et al., 2015; GAULTON et al., 1985; PALLAVICINI; NICHOLS, 1977), pouco investigada quanto aos seus efeitos nos órgãos linfoides e nas células T, tornam-se necessários estudos que avaliem, de forma comparativa, a ação desses agentes no processo de geração, maturação e função dos linfócitos, no sentido de contribuir para o melhor entendimento dos efeitos desses agentes diabetogênicos na população de células T e seu impacto na resposta imune do modelo. Essas informações serão importantes para validar as vantagens de cada modelo, ao mesmo tempo que também evidenciarão suas limitações para diferentes abordagens experimentais.

**OBJETIVO**

---

## 2. OBJETIVO

Avaliar parâmetros associados à biologia dos linfócitos T em camundongos saudáveis e diabéticos, induzidos quimicamente por ALX e STZ, a fim de demonstrar possíveis alterações no comportamento da resposta imune dessas células influenciadas pela escolha do agente diabetogênico.

Para tanto, foram avaliados os seguintes aspectos da geração, da maturação e da função dessas células em camundongos saudáveis e diabéticos:

- ✓ Determinação da contagem total e diferencial das células da medula óssea e do sangue, para determinar alterações na linfopoiese e na mielopoiese decorrentes da indução do diabetes nos diferentes modelos.
- ✓ Avaliação de parâmetros hematimétricos do sangue total, para indicação geral de alterações sistêmicas no organismo.
- ✓ Realização da imunofenotipagem dos linfócitos presentes no timo, no baço e no pâncreas dos animais saudáveis e diabéticos, para caracterização do perfil dessas células em sítios associados com seu amadurecimento (timo), sua ativação (baço) e sua função (pâncreas) durante o desenvolvimento da doença.
- ✓ Avaliação histopatológica do timo, do baço e do pâncreas, para identificação das alterações estruturais induzidas por cada modelo.
- ✓ Determinação do perfil de citocinas basais expressas e produzidas no baço e no pâncreas, para avaliação de possíveis alterações induzidas por cada modelo.
- ✓ Avaliação funcional das células T dos animais diabéticos em modelos *in vitro* e *in vivo*.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos Éticos

O presente projeto trata de um estudo experimental analítico comparativo em estrita conformidade com os princípios e diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), Brasil (protocolo número: CEUA / FCF / 388 – Anexo A).

#### 3.2 Modelo experimental

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J, na fase adulto jovem, com idade entre 12 e 14 semanas, com peso entre 18 e 25 gramas, produzidos pelo Biotério da IQ-FCF/USP. Os animais foram acondicionados em mini-isoladores, com no máximo 5 camundongos. Os camundongos ficaram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, tendo livre acesso à água e à ração. Eles passaram por período de aclimação de 7 dias, antes de serem utilizados no experimento. Diferentes materiais foram introduzidos nas gaiolas para enriquecer o ambiente dos animais (algodão, iglu, tubos de papelão, etc).

Foram incluídos no estudo animais adultos jovens e machos que apresentaram perda de peso, acompanhada de glicemia superior a 300 mg/dL (16,6 mM), após administração de ALX e STZ, conforme delineamento descrito a seguir. Não foram incluídos os animais com glicemia inferior a 300 mg/dL após o uso dos agentes diabetogênicos (AYALA et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2019).

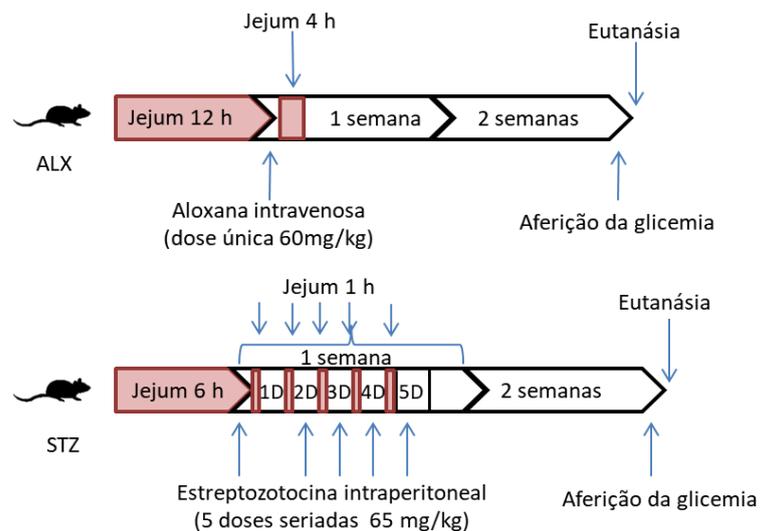
#### 3.3 Delineamento experimental

O estudo foi composto por 81 camundongos, distribuídos em 2 grupos experimentais e 1 grupo controle negativo, conforme descrito abaixo:

*1) Indução do DM1 por ALX (29 animais)* – Para indução do DM1 por ALX, os animais passaram por um período de jejum de 12 horas, antes de receberem uma injeção intravenosa (i.v), via peniana, em dose única de ALX (60 mg/kg em 100 µL) dissolvida em solução salina fisiológica (Figura 6) (AYALA et al., 2019).

**II) Indução do DM1 por STZ (23 animais)** – Para a indução de DM1 com STZ, os animais foram deixados em jejum de 5 horas, antes de receberem injeção intraperitoneal (i.p) de STZ (65 mg/kg; 300µL) dissolvida em tampão citrato de sódio a 0,05 M gelado (pH 4,0–4,5) por 5 dias consecutivos (Figura 6) (GUIMARÃES et al., 2019).

Figura 6 – Protocolo de indução DM1 por ALX e STZ



Fonte: Próprio autor. A indução do DM1 em camundongos por ALX consiste em deixar o animal em jejum de 12 horas e na aplicação de uma única dose de 60 mg/kg diluídos em 100 µL de solução salina estéril por via i.v, aguardando-se período de 15 dias para o completo estabelecimento da condição insulina dependente para a realização da eutanásia e ensaios propostos pelo delineamento experimental. Na indução por STZ, é necessário o jejum de 6 horas e a administração de 5 doses consecutivas de 65 mg/kg por dia diluída em 300 µL de citrato de sódio 0,5 M estéril, aguardando o período de 15 dias, a partir da primeira dose, para confirmação do estabelecimento da condição insulina dependente, para realização da eutanásia e de ensaios propostos pelo delineamento experimental.

**III) Controle (animais não diabéticos) (29 animais)** – Foi formado um grupo controle com os animais, isentos de qualquer estresse.

### 3.4 Dosagem sérica de glicose

Após 15 dias da indução do diabetes, todos os animais foram imobilizados manualmente. Com o auxílio de uma lanceta, foi coletada uma gota de sangue da cauda para dosagem da glicemia, determinada através de um monitor de glicose (Accu-Chek Active, Brasil), conforme orientação do fabricante. Animais que apresentaram glicemia maior do que 300mg/dL e a perda de peso, foram utilizados nos experimentos subsequentes.

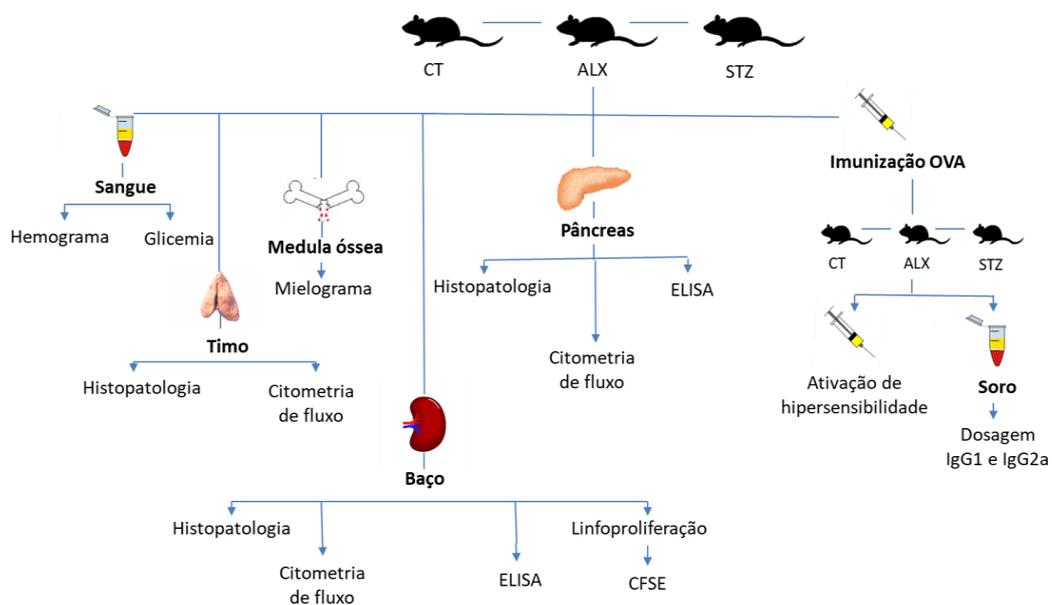
### 3.5 Coleta das amostras biológicas

Os animais selecionados para o experimento tiveram seu sangue coletado por meio de sangria, pela veia facial, com o anticoagulante  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , que foi posteriormente encaminhado para as análises hematimétricas. Após isso, os animais foram rapidamente eutanasiados, por meio do deslocamento cervical, e, em seguida, foi feita a coleta das demais amostras.

As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade femoral, com 3 mL de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (GIBCO™, EUA); a suspensão celular foi armazenada em tubos de 1,5 mL, mantidos no gelo até a condução dos experimentos com a amostra.

Em seguida, o baço, o timo e o pâncreas foram coletados, em condições assépticas. Aproximadamente 1/3 de cada um dos órgãos foi armazenado em solução fixadora, para posteriores análises histológicas. Outro 1/3 de cada órgão foi homogeneizado em tampão de lise (RIPA: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Triton-X; 1% Deoxicolato de sódio e 0,1% de SDS) ou por meio do reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), com o auxílio de um homogeneizador (Politron), associando a um inibidor de proteases, obtendo-se, como produto final, um homogenato celular, que foi alíquotado e congelado em  $-80^\circ\text{C}$ , para as análises de ELISA e qRT-PCR. O 1/3 restante dos órgãos foi processado em meio RPMI 1640, para imunofenotipagem das células por citometria de fluxo e para avaliações funcionais *in vitro* (baço) (Figura 7), conforme descrito a seguir.

Figura 7 – Delineamento experimental



Os animais foram divididos em três grupos (CT, ALX e STZ) e em duas condições (não imunizados e imunizados com OVA) e foram submetidos ao tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg, 1 dose e STZ 65 mg/kg, 5 doses), para coleta das amostras biológicas e realização dos ensaios propostos. O sangue total foi destinado para realização do hemograma completo, aferição da glicemia e dosagem dos anticorpos (Ac) específico para OVA no grupo imunizado. O timo foi destinado para histopatologia e citometria de fluxo. A medula óssea foi utilizada para o mielograma. O baço foi aproveitado para histopatologia, citometria de fluxo, ELISA e linfoproliferação para CFSE e Alamar blue. O animal *in vivo*, para indução da resposta adaptativa por OVA. O pâncreas foi destinado para histopatologia, citometria de fluxo e ELISA.

### **3.6 Avaliação dos índices hematimétricos**

A avaliação dos índices hematimétricos foi feita com a amostra do sangue total obtida no item 3.5 com o anticoagulante Na<sub>2</sub>-EDTA (diluição 1:10), no analisador hematológico automático BC-2800Vet da Mindray, do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os parâmetros hematológicos analisados foram: glóbulos vermelhos, leucócitos, plaquetas, hematócrito, plaquetócrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, largura de distribuição de eritrócitos, volume corpuscular médio, linfócitos, porcentagem de linfócitos, granulócitos, porcentagem de granulócito, monócito, porcentagem de monócito, volume plaquetário médio e amplitude de distribuição plaquetária.

### **3.7 Contagens total e diferencial dos leucócitos**

O lavado da cavidade femoral, coletado de acordo com o item 3.5, foi centrifugado (300 x g, 5 minutos, 4°C), sendo o sobrenadante descartado, as hemácias lisadas com tampão ACK (0,5mL, 2 minutos) (ThermoFisher Scientific, EUA) e as células restantes ressuspendidas em 1 mL de RPMI 1640. A suspensão de células foi diluída na proporção 1/50 com líquido de Turk e a contagem de células foi determinada em câmara de Neubauer. A suspensão de células foi centrifugada em lâminas a 400 x g, 5 minutos, 4°C, usando uma citocentrífuga Cytospin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e deixadas secar por 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram preparadas pelo método de coloração por panótico rápido. A contagem diferencial foi realizada considerando um total de 100 células da linhagem branca, avaliadas por microscopia de luz, segundo os critérios morfológicos para blasto, neutrófilos imaturos, neutrófilos maduros, linfócitos e monócitos totais utilizando-se a objetiva de imersão (BOLLIGER, 2004; YANG et al., 2013).

### 3.8 Imunofenotipagem dos linfócitos nos tecidos por citometria de fluxo

Os linfócitos presentes nas amostras de timo, baço e pâncreas foram fenotipados no citômetro de fluxo FACSCanto II, do Serviço de Citometria do Departamento de Imunologia – ICB/USP, em colaboração com o Prof. Dr. Anderson de Sá-Nunes, do Laboratório de Imunologia Experimental. Para tanto, os órgãos foram macerados em peneiras com poros de 40  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences, EUA), com ajuda de um êmbolo de seringa estéril, para a separação das células. O material foi centrifugado, o sobrenadante foi desprezado, as hemácias foram lisadas com tampão ACK (ThermoFisher Scientific, EUA), as células foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão celular ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL ressuspendidas em tampão de citometria de fluxo (PBS contendo 2% de soro fetal bovino). As células foram incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 por 15 minutos, a 4°C, para bloqueio dos receptores Fc presentes em fagócitos, a fim de eliminar ligações inespecíficas. Em seguida, foi feita a marcação com um painel contendo os seguintes anticorpos conjugados com fluorocromos: anti-CD11b (para exclusão de células mielóides), anti-CD3 (para população total de linfócitos T), anti-CD4 (para população de linfócitos T auxiliares), anti-CD8 (para os linfócitos T citotóxicos), anti-CD25 e anti-FoxP3 (para as células Treg) e, ainda, anti-CD19 (para os linfócitos B). A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o *software* FlowJo, versão 7.5.5 (Tree Star, EUA).

Tabela 2 – Anticorpos utilizado para imunofenotipagem dos linfócitos por FACS

Anticorpos	Fluorocromos	Marca	Clone
CD16/CD32	-	BD Biosciences	2.4G2
CD3	PE	Biolegend	17A2
CD4	APC	BD Biosciences	RM4-5
CD8	PEcy 5	BD Biosciences	53-6.7
CD19	PEcy 7	Biolegend	6D5
CD25	PB	Biolegend	PC61
FOXP3	AF488	Biolegend	MF-14
CD11b	Apccy-7	Biolegend	M10/70

### 3.9 Avaliação da ativação dos linfócitos *in vitro*

Os linfócitos presentes nos homogenatos de baço foram avaliados quanto à proliferação celular, um dos parâmetros da ativação dessas células. Para isso, as células foram marcadas com CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*)-FITZ, conforme descrito por Quah et al. (2007), e uma suspensão celular contendo  $5 \times 10^6$  células/mL foi preparada e distribuída em alíquotas de 500  $\mu$ L em placas de 24 poços com fundo plano. Essas células foram incubadas com meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovina, 2mM de L-glutamina, 100 unidade/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, 25 mM de Herpes e  $2,5 \times 10^{-5}$  M de 2-mercaptoetanol - controle negativo) ou estimuladas com 0,5  $\mu$ g/mL e 1  $\mu$ g/mL de concanavalina A (Con A). Após 72 horas de cultura as células foram marcadas com anti-CD4 (para população de linfócitos T auxiliares), anti-CD8 (para os linfócitos T citotóxicos) e a proliferação foi determinada nas células provenientes dos diferentes grupos experimentais pela diluição do CFSE ou pelo ensaio colorimétrico usando *Alamar blue*, conforme padronizado por Ahmed et al. (1994).

### 3.10 Dosagem de citocinas por ELISA

As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, e IL-17 foram dosados no Laboratório de Imunologia Experimental, em colaboração com o Prof. Dr. Anderson de Sá-Nunes, em amostras do baço e do pâncreas, por meio dos kits ELISA (R&D Systems Inc., EUA; BD Biosciences, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foi adicionado com 100  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura (anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL1, anti-IL2, anti-IL6, anti-IL-10, anti-IL-12 e anti-IL-17) diluído em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5, nas placas de 96 poços. Após o término da incubação *overnight* a 4°C, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 0,05% (300  $\mu$ L/poço) e, em seguida, bloqueadas com 200  $\mu$ L/poço de PBS/BSA por 1 h, à temperatura ambiente. Após três lavagens, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço do homogenato celular em tampão lise, devidamente diluídos, e incubados por 2 h, à temperatura ambiente. Após o ciclo de 5 lavagens, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de solução de detecção (anticorpo secundário biotilado e estreptoavidina conjugada com peroxidase), diluída em PBS/BSA, e a placa foi incubada à temperatura ambiente, por 2 h. Após 7 lavagens, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço da solução substrato 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB), seguida por incubação de 30 min, à temperatura ambiente, protegido da luz. Para parar a reação, foram adicionados 50  $\mu$ L/poço de ácido fosfórico

(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1 M. A leitura da placa foi feita em um espectrofotômetro a 450 nm, imediatamente após o bloqueio da reação. A concentração das citocinas presente nas amostras foi calculada com base na curva padrão de cada citocina.

O valor obtido das citocinas foi multiplicado pelo inverso do valor da quantidade de proteínas em cada alíquota dos órgãos dosados pela técnica de BCA (*Bicinchoninic acid*) (10x), obtendo um resultado em picogramas (pg) de citocina por microgramas (µg) de proteína do tecido

### **3.11 Dosagem anticorpos IgG1 e IgG2a por ELISA**

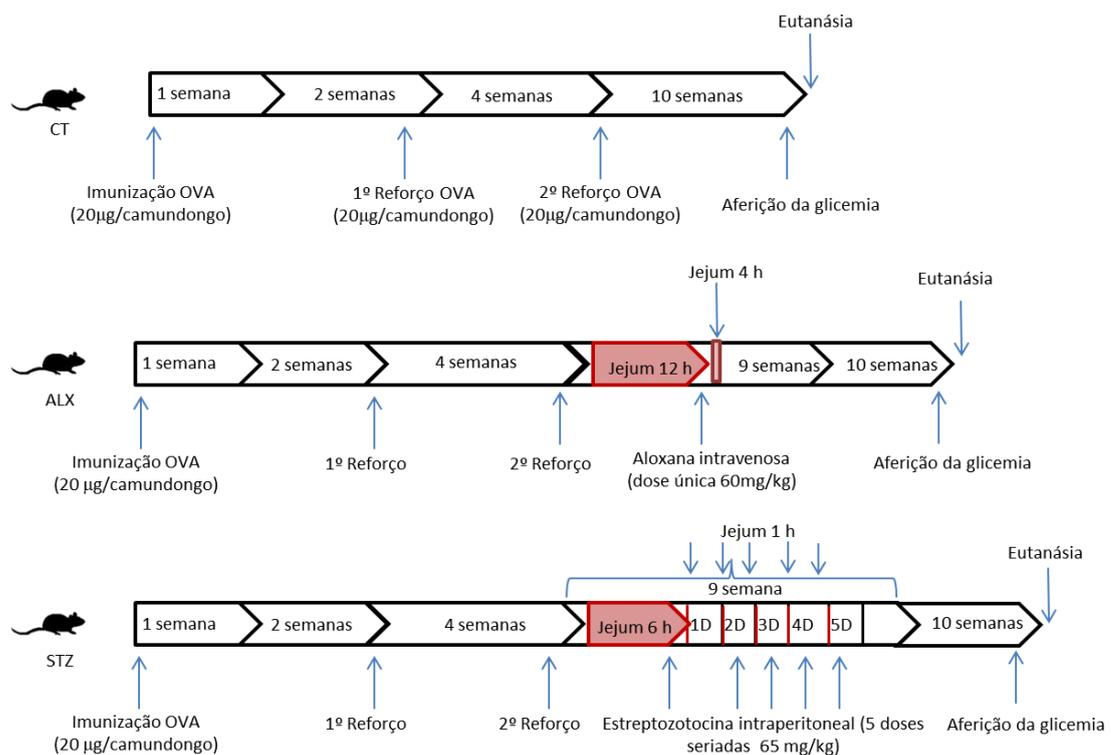
Os anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para OVA foram dosados no Laboratório de Imunologia Experimental, em colaboração com o Prof. Dr. Anderson de Sá-Nunes, em amostras do soro de animais imunizados com OVA, por anticorpos IgG1 e IgG2a (BD Biosciences, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foi adicionado com 100 µL/poço do anticorpo de OVA 5 ng/ml diluído em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5, nas placas de 96 poços. Ao término da incubação *overnight* a 4°C, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 0,05% (300 µL/poço) e, em seguida, bloqueadas com 200 µL/poço de PBS/BSA por 1 h, à temperatura ambiente. Após três lavagens, foram adicionados 100 µL/poço do soro puro dos animais imunizados, e incubados por 2 horas, à temperatura ambiente. Após o ciclo de 5 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço de solução de detecção (anticorpo secundário biotilado e estreptoavidina conjugada com peroxidase), diluída em PBS/BSA, e a placa foi incubada à temperatura ambiente, por 2 h. Após 7 lavagens, foram acrescentados 100 µL/poço da solução substrato 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB), seguida por incubação por, no máximo, 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Para parar a reação, foram adicionados 50 µL/poço de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1 M. A leitura da placa foi feita em um espectrofotômetro a 450 nm, imediatamente após o bloqueio da reação.

### **3.12 Avaliação da ativação da resposta imune adaptativa *in vivo***

Para avaliar de forma indireta a funcionalidade das células T *in vivo*, em animais saudáveis e diabéticos, foi empregada a avaliação da resposta imune adaptativa decorrente da imunização com ovalbumina (OVA). Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia Experimental, em colaboração com o Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes, do Departamento de Imunologia, ICB/USP. Para isso, os animais foram imunizados

subcutaneamente em ambos os lados do flanco dorsal inferior com 100  $\mu$ L de uma emulsão de adjuvante esqualeno contendo OVA diluída em PBS (10  $\mu$ g/camundongo). Os animais receberam 2 reforços consecutivos contendo a mesma dose do antígeno, com intervalos de 15 dias. Duas semanas após a última imunização, os camundongos foram submetidos aos tratamentos com os agentes diabetogênicos e aqueles que se tornaram diabéticos foram desafiados no coxim plantar com 10  $\mu$ g de OVA diluída em salina (Figura 8). A pata contralateral foi inoculada com salina apenas para avaliação de reações inespecíficas a ovelículo usado. O desenvolvimento da ativação da resposta adaptativa foi avaliado pelo edema da pata, determinado por meio da diferença entre a medida da espessura da pata antes e após 6 horas do desafio utilizando-se um paquímetro de precisão (Mitutuyo 7301, Japão).

Figura 8 – Protocolo de imunização por OVA e indução do DM1 por ALX e STZ



Para imunização dos grupos com OVA, foi feita a administração de 10  $\mu$ g de OVA, diluída em 100  $\mu$ L de uma emulsão contendo esqualeno em ambos os flancos do animal. Após 15 dias, foi dado um reforço da dose e, em mais 15 dias, um segundo reforço da dose. Após 15 dias a partir da administração do segundo reforço, é iniciado o tratamento com os agentes diabetogênicos ALX e STZ, para indução do DM1. Ao fim do protocolo, os animais são desafiados com 10  $\mu$ g/mL de OVA no coxim plantar, sendo que a resposta adaptativa é avaliada indiretamente pela formação do edema contra OVA. Em seguida, os animais foram eutanasiados para realização dos demais ensaios propostos pelo delineamento experimental.

### **3.13 Histopatologia**

Para a análise histológica, com amostras do timo, do baço e do pâncreas, os órgãos foram fixados em solução formol 10%. Após a fixação, os materiais foram desidratados em etanol, em diferentes concentrações crescentes (70% a 100%), diafanizados em xilol e incluídos em blocos de parafina. Após a inclusão, foram obtidos cortes transversais, com aproximadamente 3µm de espessura, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (HE), sendo feitas as avaliações em leitura de microscopia óptica.

As alterações estruturais dos órgãos foram descritas e classificadas em uma análise semiquantitativa e qualitativa duplo cego, conforme os critérios de histológicos descritos por Elmore (2006a) para o timo, Elmore (2006b) para o baço, e Shah et al. (2018) para o pâncreas, considerando-se um score: ausente, quando não houve comprometimento do tecido, pontuação = 0; discreto, com até 25% de comprometimento da área, pontuação = 1; moderado, de 26% a 50% do comprometimento da área, pontuação = 2; e acentuado, com mais de 50% de comprometimento da área, pontuação = 3.

### **3.14 Análise estatística**

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni's, usando o programa GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA). Considerou-se significativo  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

---

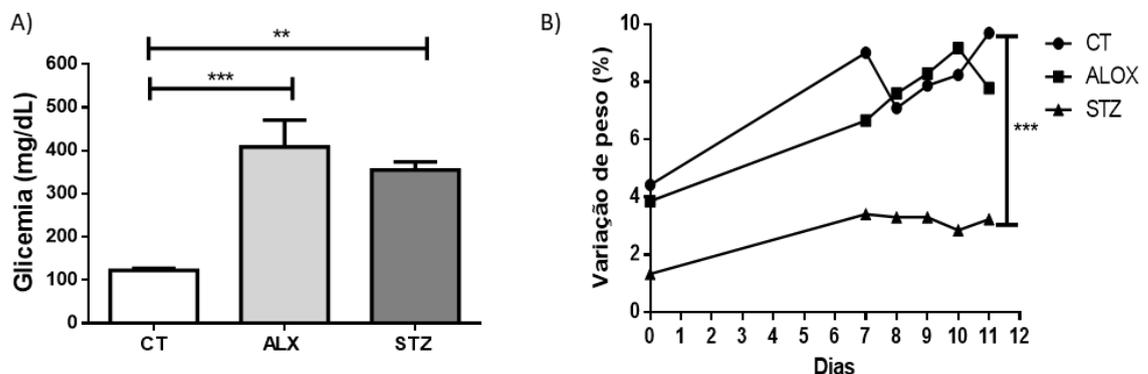
## 4. RESULTADOS

O presente estudo investigou, de forma comparativa, os parâmetros associados à biologia dos linfócitos T em camundongos machos da linhagem C57BL/6J sadios e com diabetes induzido quimicamente por ALX e STZ, a fim de identificar alterações causadas no desenvolvimento, na maturação e na função dos linfócitos T, bem como as alterações histológicas geradas pela ação dos agentes diabetogênicos no pâncreas, no timo e no baço.

### 4.1 Caracterização dos modelos

Os animais foram divididos em três grupos: a) CT; b) ALX e c) STZ. Os grupos diabéticos foram submetidos ao tratamento com os agentes diabetogênicos ALX e STZ e após 15 dias da administração da 1ª. dose dos agentes, verificou-se que tanto os animais induzidos com ALX e quanto com STZ apresentaram características do DM1, como hiperglicemia, com uma perda de peso severa do grupo STZ, enquanto que, no mesmo período, os animais CT apresentaram normoglicemia e ganho de peso normal, conforme a Figura 9 (Apêndice I).

Figura 9 - Avaliação da glicemia e peso



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram seu peso acompanhado do 7º aos 11º dias e a sua glicemia aferida no 15º dia, em amostra de sangue coletada da cauda, para caracterização dos grupos. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M.

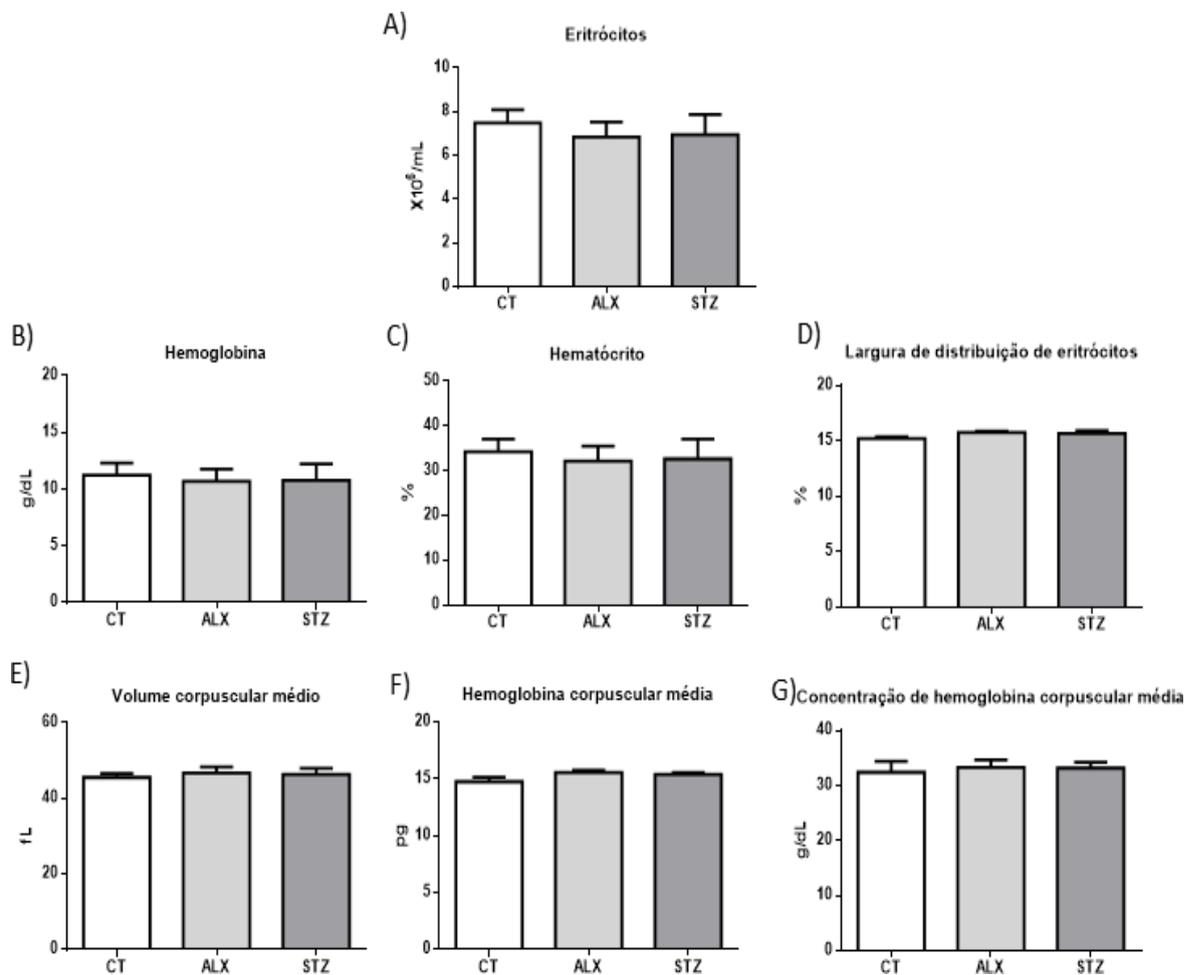
\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

## 4.2 Avaliações hematimétricas

A análise do hemograma revelou normalidade dos perfis eritrocitário e plaquetário para os parâmetros avaliados, tanto entre os animais CT quanto entre os animais diabéticos ALX e STZ, conforme as Figuras 10 e 12 (Apêndice II).

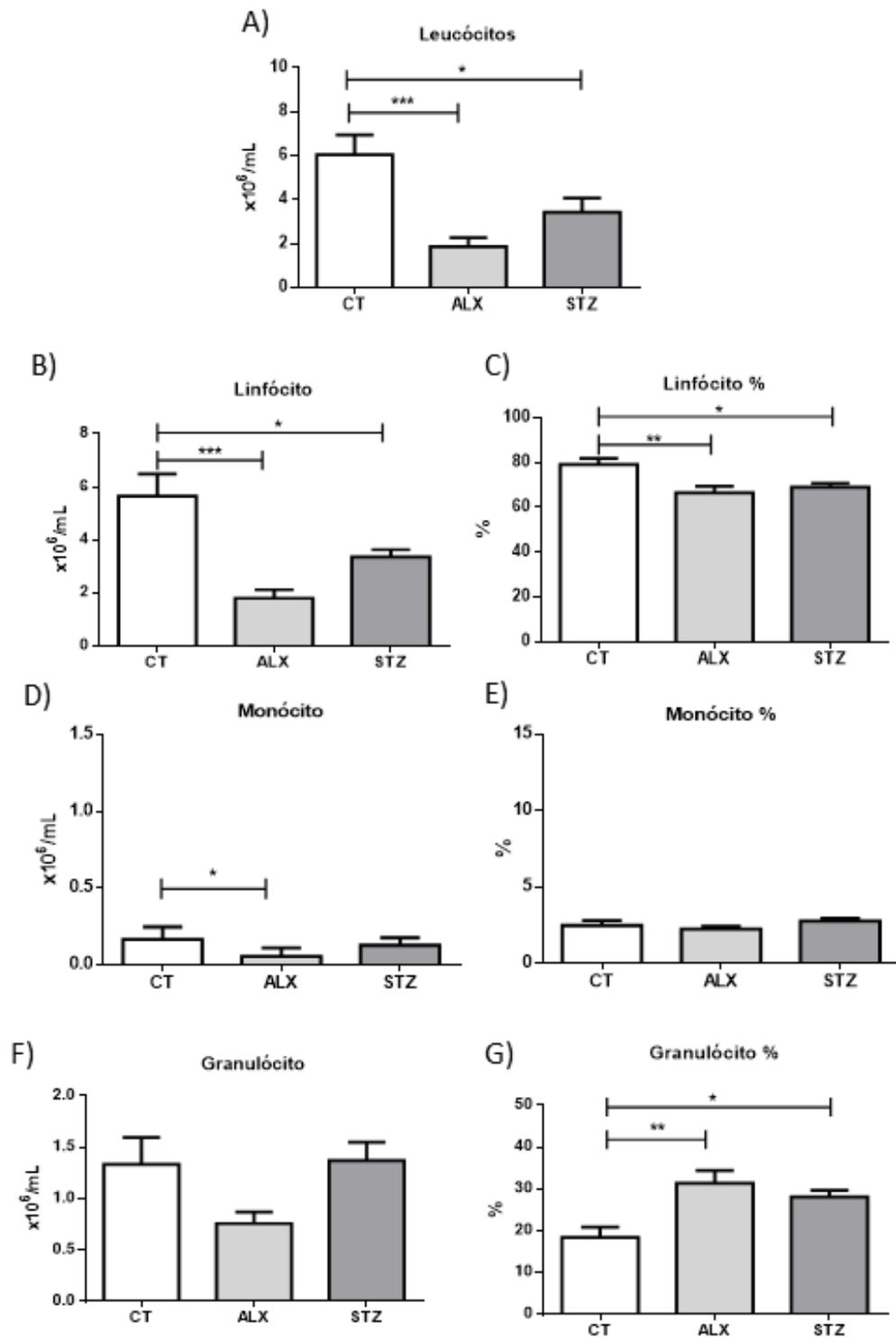
O perfil leucocitário dos animais diabéticos ALX apresentou diminuições nos valores de leucócitos totais, linfócitos, porcentagem de linfócitos e monócito, e apresentou aumento na porcentagem de granulócito em referência aos animais CT. Enquanto os animais diabéticos STZ apresentaram resultados semelhantes na diminuição de leucócitos, linfócitos e porcentagem de linfócitos, e no aumento na porcentagem de granulócito quando comparados aos animais CT, conforme a Figura 11 (Apêndice II).

Figura 10 – Valores da série eritrocitária



Após o tratamento com os agentes diabotogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram seu sangue coletado com anticoagulante  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , pelo plexo facial, sendo avaliados seus parâmetros totais e diferenciais por hemocitometria. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

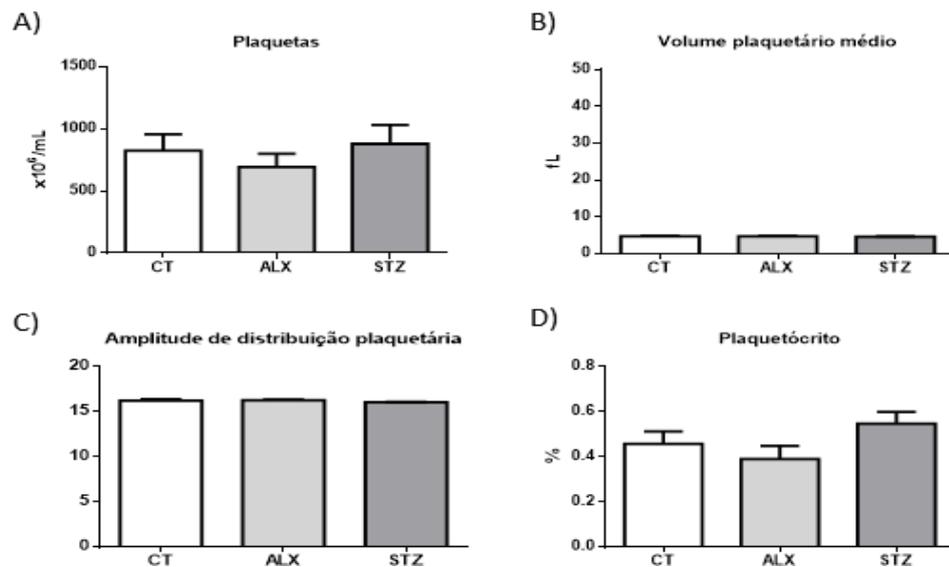
Figura 11 – Valores da série leucocitária



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram seu sangue coletado com anticoagulante Na<sub>2</sub>-EDTA, pelo plexo facial, sendo avaliados seus parâmetros totais e diferenciais por hemocimetria. Os valores representam a média ± E.P.M.

\**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

Figura 12 – Valores da série plaquetária



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram seu sangue coletado com anticoagulante Na<sub>2</sub>-EDTA, pelo plexo facial, sendo avaliados seus parâmetros totais e diferenciais por hemocitometria. Os valores representam a média ± E.P.M. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação (6-9 animais CT e 7-11 animais ALX e STZ).

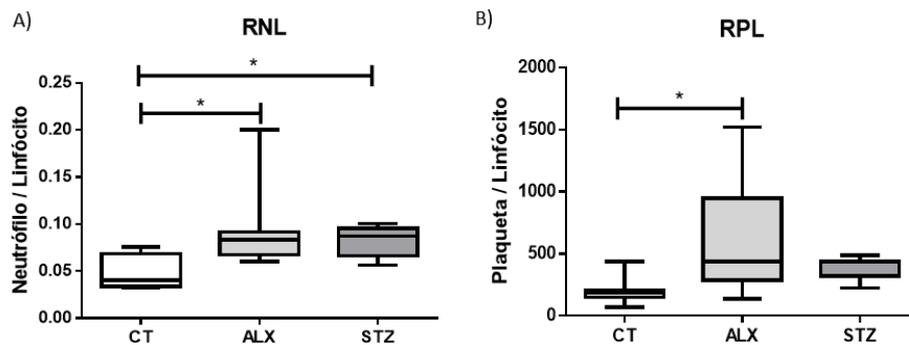
A Razão Neutrófilo/Linfócito (RNL) e a Razão Plaqueta/Linfócito (RPL), calculadas a partir de dados do hemograma e que têm sido implicadas em marcadores inflamatórios, apresentam alteração quando comparadas entre o grupo CT e os diabéticos ALX e STZ, conforme a Tabela 3 e a Figura 13 (Apêndice II).

Tabela 3 – Parâmetros hematimétricos

	CT	ALX	STZ
Leucócitos totais, 10 <sup>9</sup> /L	6,7 (3,8-10,4)	2,7 (1,3-4,2) *	4,7 (3,4-6,9) *
Neutrófilos totais, 10 <sup>9</sup> /L	0,24 (0,14- 0,48)	0,16 (0,08-0,26)	0,24 (0,18-0,44)
Linfócitos totais, 10 <sup>9</sup> /L	5,3 (3- 8,8)	2 (0,8-2,8) *	3,5 (2,3- 4,5) *
Plaquetas, 10 <sup>9</sup> /L	933 (471-1315)	920 (380-1326)	1309 (731-1567)
RNL	0,04 (0,03-0,07)	0,08 (0,06-0,2) *	0,08 (0,05-0,1) *
RPL	183,1 (67,2-438,3)	438 (135,7- 1041,1) *	324,4 (222,9- 485,1) *

Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram seu sangue coletado com anticoagulante Na<sub>2</sub>-EDTA, pelo plexo facial, sendo avaliados seus parâmetros totais e diferenciais por hemocitometria, dos quais, a partir dos resultados gerados, foram calculados os valores da RNL e da RPL. Os valores representam a média ± E.P.M. \**p*<0,05. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

Figura 13 – Razão Neutrófilo/Linfócito (RNL) e a Razão Plaqueta/Linfócito (RPL)



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram seu sangue coletado com anticoagulante  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , pelo plexo facial, sendo avaliados seus parâmetros totais e diferenciais por hemocimetria, dos quais, a partir dos resultados gerados, foram calculados os valores de A) Razão Neutrófilo/Linfócito (RNL); e B) Razão Plaqueta/Linfócito (RPL). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M.  $*p < 0,05$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

A contagem diferencial da medula óssea revelou uma alteração no grupo STZ, com aumento na porcentagem de neutrófilos maduros totais e diminuição dos linfócitos totais, quando comparado ao grupo CT. Fenótipo semelhante ocorreu com o grupo ALX, porém as diferenças observadas não atingiram significância estatística em relação ao controle. Não foram observadas diferenças na porcentagem de blastos, neutrófilos imaturos ou monócitos totais quando comparados o grupo CT e ambos os grupos diabéticos (Tabela 4 e Apêndice II).

Tabela 4 – Parâmetros hematimétricos da medula óssea

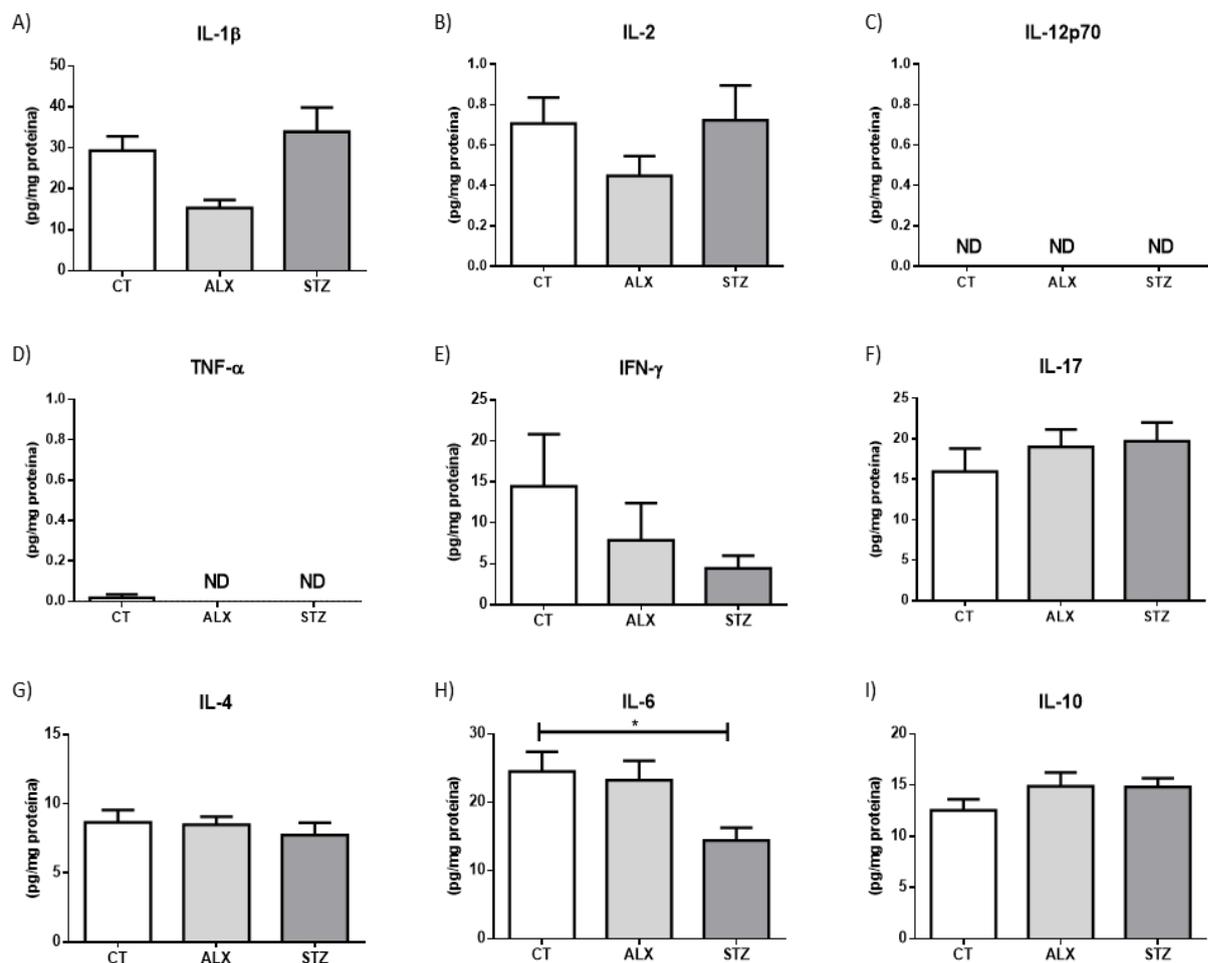
Células (%)	CT	ALX	STZ
Blasto totais	0,2 $\pm$ 0,2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Neutrófilos imaturos totais	3,3 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 1	1,5 $\pm$ 0,7
Neutrófilos maduros totais	67 $\pm$ 1,9	75,6 $\pm$ 4,2	81 $\pm$ 2,1**
Linfócitos totais	27,5 $\pm$ 2,3	19,2 $\pm$ 4	16,5 $\pm$ 2,5*
Monócito totais	2 $\pm$ 0,7	2 $\pm$ 0,5	1 $\pm$ 0,4

Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o material da sua medula femoral obtido por lavagem do canal medular com RPMI e preparado em lâmina pelo método de cytopspin e coloração panóptico rápido, sendo feita a contagem manual diferencial de 100 células em microscópio óptico. Os valores representam a porcentagem  $\pm$  E.P.M.  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

### 4.3 Análise de citocinas no homogenato de baço e pâncreas

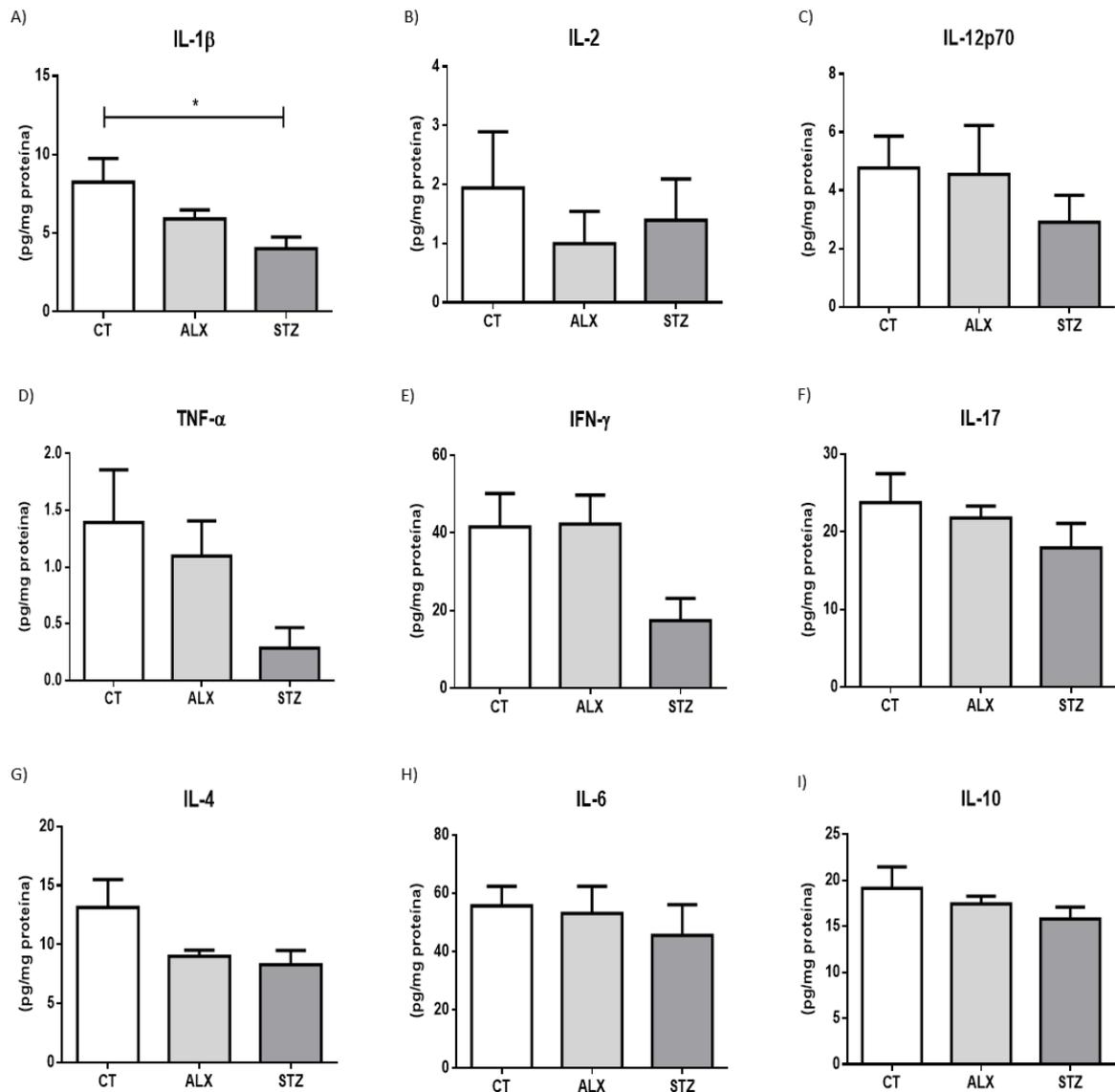
A expressão basal das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70 e IL-17 foram avaliadas no homogenato de baço e pâncreas. Nessas amostras, apenas os animais STZ apresentaram alterações, com a redução da IL-6 no baço e da IL-1 $\beta$  no pâncreas em relação aos animais CT. Para as demais citocinas, não houve diferença estatisticamente significativa na sua expressão basal, conforme as Figuras 14 e 15 (Apêndice III).

Figura 14 – Citocinas no baço



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o baço coletado e o homogenato do tecido foi preparado em tampão RIPA, para análise das citocinas por técnica de ELISA. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p$ <0,05. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

Figura 15 – Citocinas no pâncreas

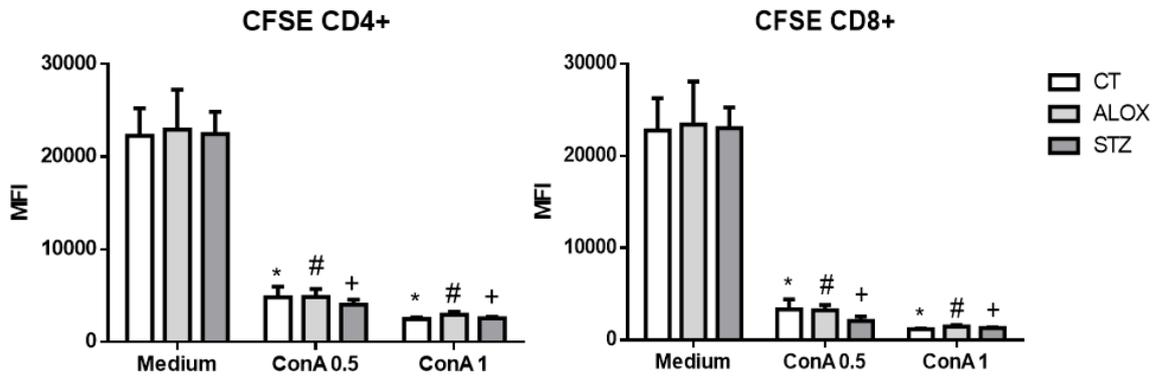


Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o pâncreas coletado e o homogenato do tecido foi preparado em tampão RIPA, para análise das citocinas por técnica de ELISA. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

#### 4.4 Avaliação da capacidade proliferativa dos linfócitos *in vitro*

Análises da capacidade proliferativa dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, isolados do baço e estimulados com Con A, mostram que o processo linfoproliferativo dos animais ALX e STZ não foram alterados em relação aos animais CT, conforme a Figura 16 (Apêndice IV).

Figura 16 –Capacidade proliferativa de linfócitos

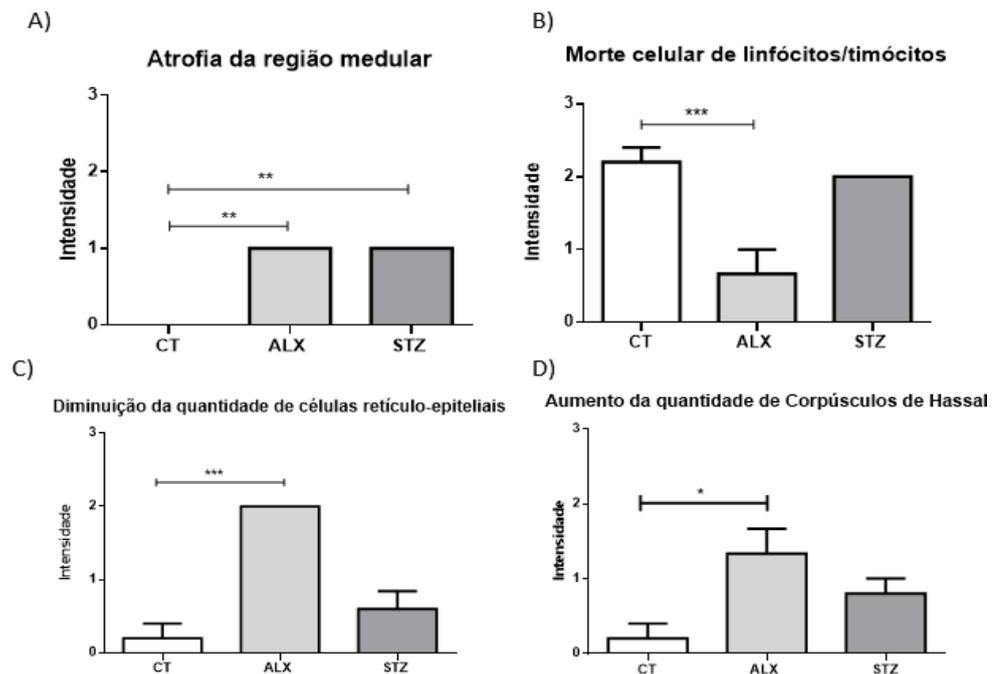


Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o baço coletado e processado em tampão RPMI completo, com linfócitos marcados com CFSE, incubados com Meio, ConA 0,5 e ConA 1  $\mu\text{g/mL}$ , por 72 horas, e marcados com CD4+ e CD8+ para análise da proliferação celular por citometria de fluxo. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,0001$  versus respectivo controle; # $p < 0,0001$  versus respectivo controle; + $p < 0,0001$  versus respectivo controle. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA- uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

#### 4.5 Avaliação histológica do timo, do baço e do pâncreas

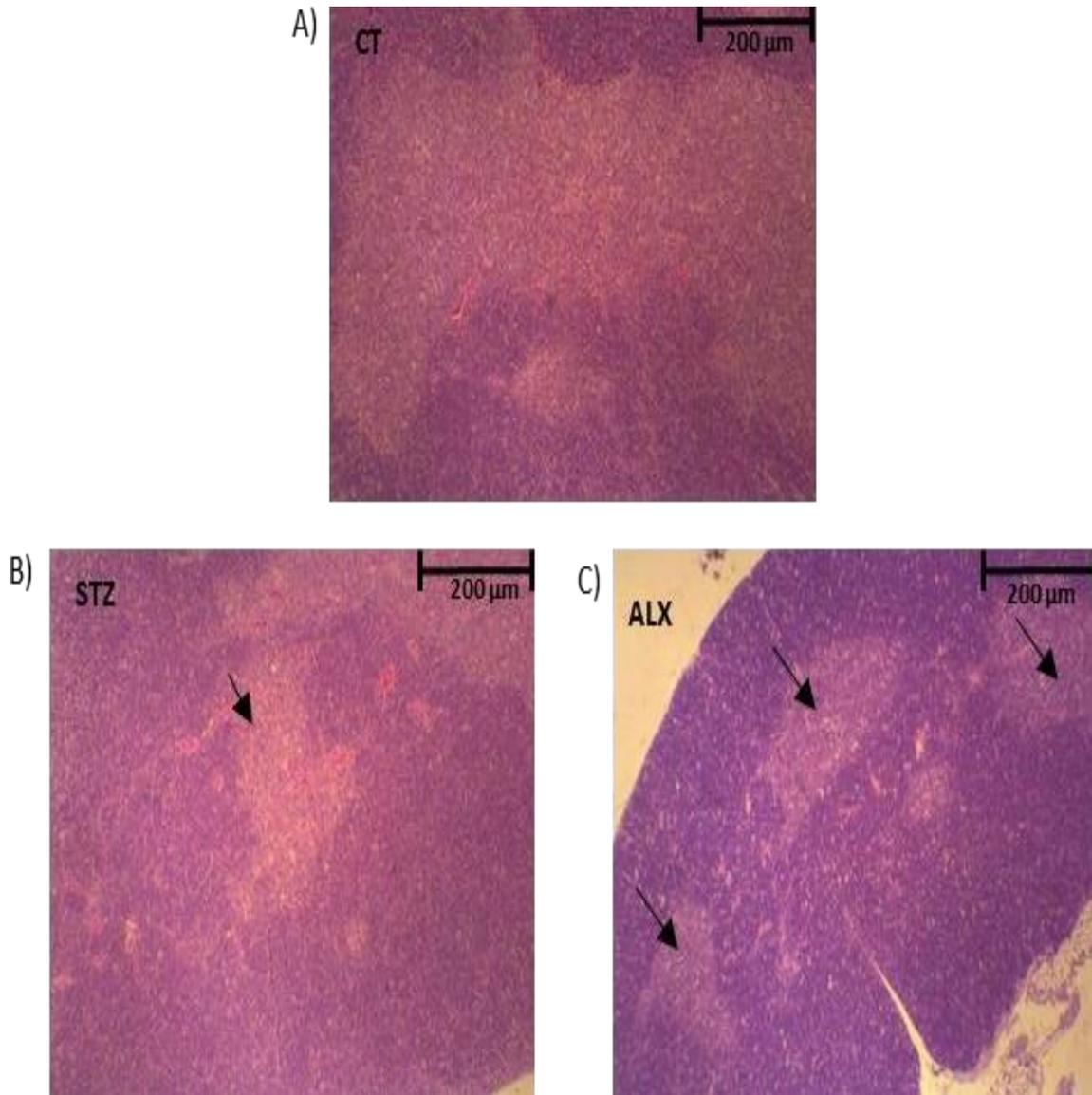
Quanto às análises histológicas estruturais do timo, foi verificada maior diminuição da quantidade de células retículo-epiteliais, na quantidade de corpúsculo de Hassall, na morte celular de linfócitos/timócitos e na atrofia da região medular nos animais ALX quando comparados aos animais CT, sendo a atrofia da região medular um achado presente também nos animais do grupo STZ (Figuras 17 e 18), indicado por setas na Figura 18 (Apêndice V).

Figura 17 – Alterações histológicas do timo



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o timo coletado e armazenado em formol 10%; foram preparadas lâminas em cortes histológicos de 3  $\mu$ m corados com H.E e analisados em microscópio óptico. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

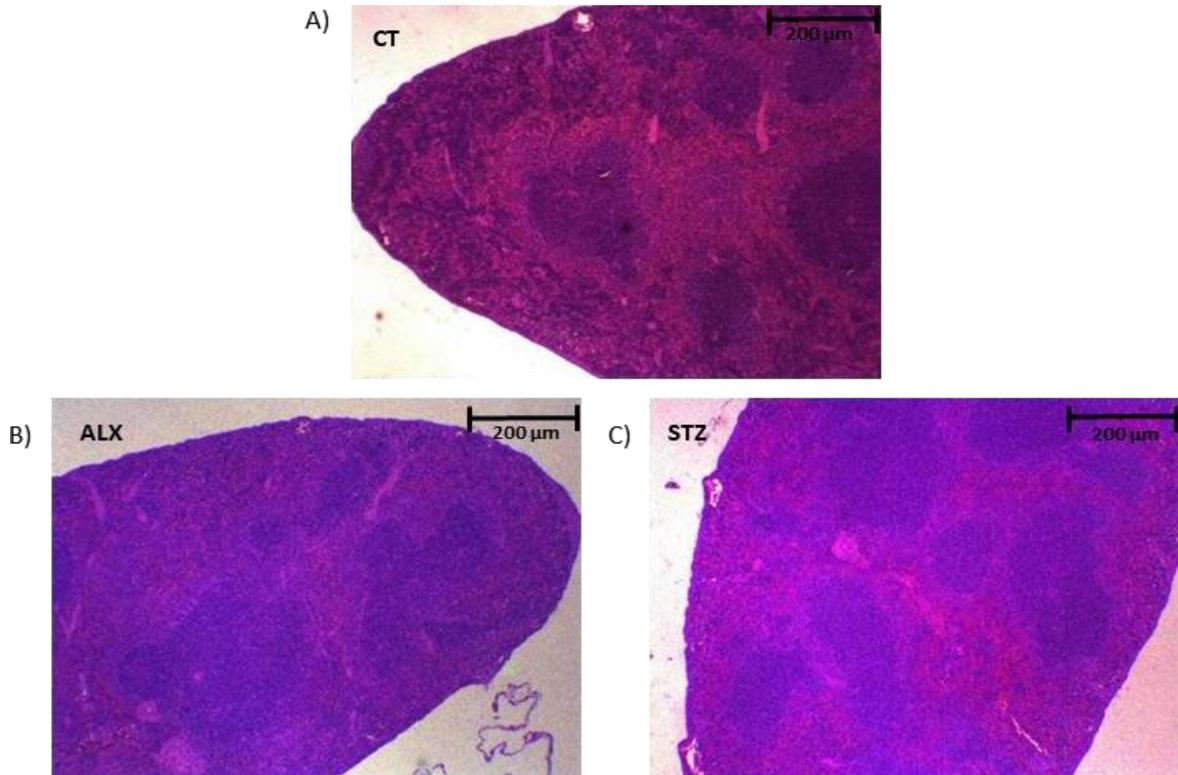
Figura 18 – Atrofia da região medular do timo em animais diabéticos



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o timo coletado e armazenado em formol 10%; foram preparadas lâminas em cortes histológicos de 3  $\mu$ m corados com H.E e analisados em microscópio óptico, com setas indicando a região de atrofia medular. Escala 200  $\mu$ m.

O baço de todos os animais apresentou normalidade em sua estrutura, conforme observado na Figura 19.

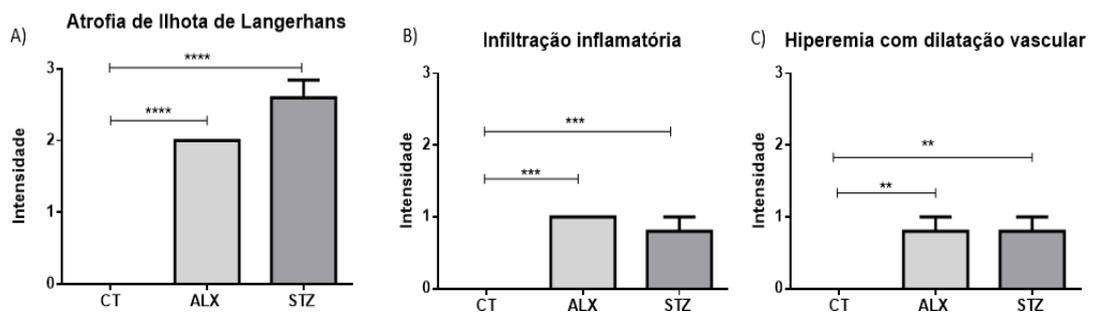
Figura 19 – Integridade estrutural do baço em animais controle e diabéticos



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o baço coletado e armazenado em formol 10%; foram preparadas lâminas em cortes histológicos de 3 µm corados com H.E e analisados em microscópio óptico. Escala 200 µm.

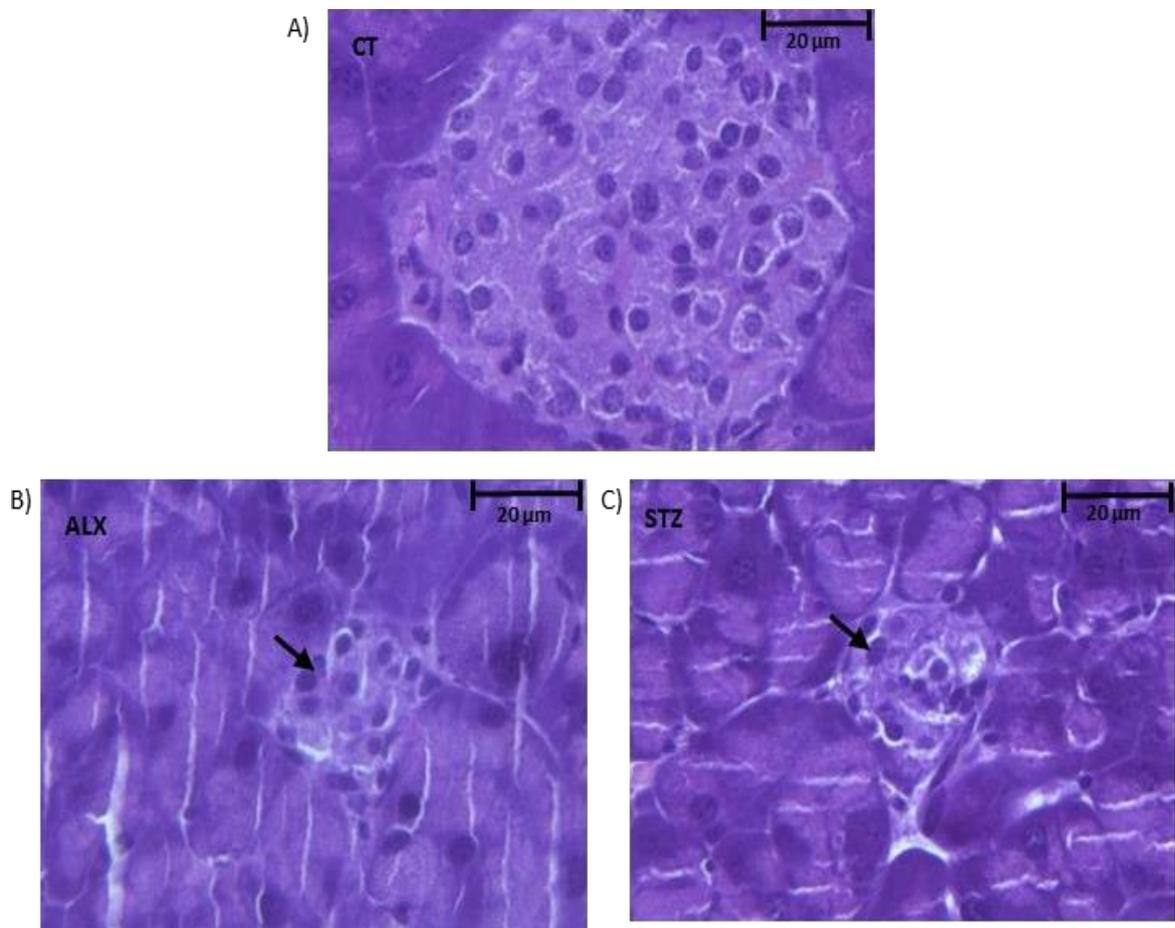
O pâncreas dos animais diabéticos, ALX e STZ, apresentou infiltração inflamatória, hiperemia com dilatação vascular e atrofia da ilhota de Langerhans quando comparado à estrutura dos animais CT (Figuras 20 e 21), sendo a atrofia da ilhota de Langerhans indicada por setas na Figura 21 (Apêndice V).

Figura 20 – Alterações histológicas do pâncreas



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o pâncreas coletado e armazenado em formol 10%; foram preparadas lâminas em cortes histológicos de 3 µm corados com H.E e analisados em microscópio óptico. Os valores representam a média ± E.P.M. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

Figura 21 – Atrofia das ilhotas de Langerhans no pâncreas de animais diabéticos

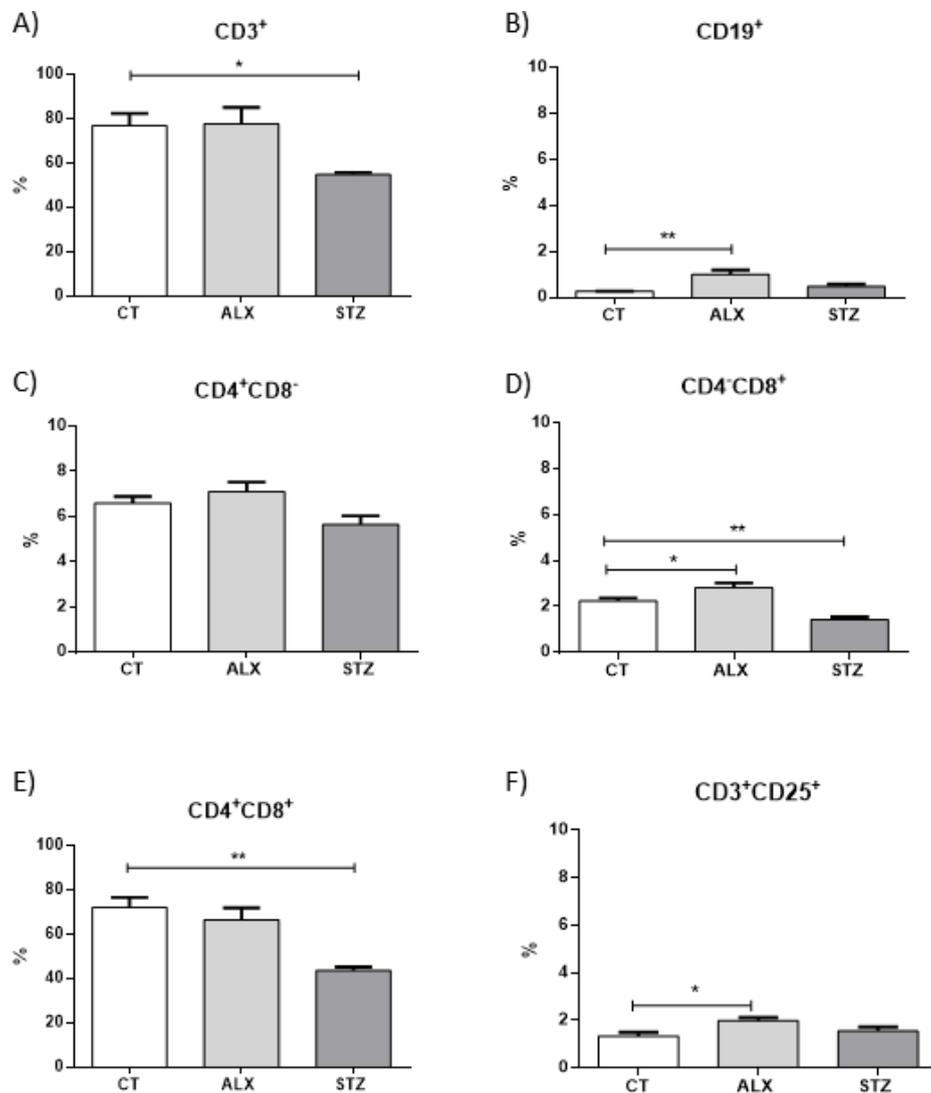


Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o timo coletado e armazenado em formol 10%; foram preparadas lâminas em cortes histológicos de 3 µm corados com H.E e analisados em microscópio óptico, com setas indicando região de atrofia da ilhota de Langerhans. Escala 20 µm.

#### 4.6 Avaliação da população de linfócitos T e B presentes em timo, baço e pâncreas

A caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo dos linfócitos presentes no timo revelou diminuição na porcentagem de linfócitos totais ( $CD3^+$ ), linfócitos T duplo positivos ( $CD4^+CD8^+$ ) e linfócitos T citotóxicos dos animais STZ, comparados aos animais CT (Figura 21), e aumento na porcentagem de linfócitos B ( $CD19^+$ ), linfócitos T citotóxicos ( $CD4^-CD8^+$ ) e linfócitos T  $CD3^+CD25^+$  dos animais ALX, sendo esse último a única análise possível, uma vez que as marcações para  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  não apresentaram positividade nas análises, conforme a Figura 22 (Apêndice VI).

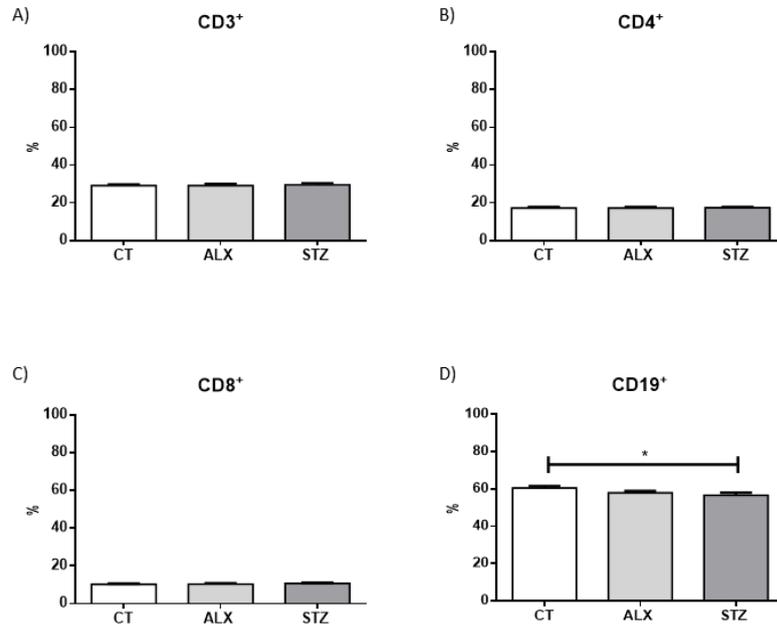
Figura 22 – Imunofenotipagem da população dos linfócitos do timo



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o timo coletado e processado em tampão RPMI, com suas células marcadas com CD11b, CD3, CD4, CD8, CD25 e CD19 e avaliadas por citometria de fluxo. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

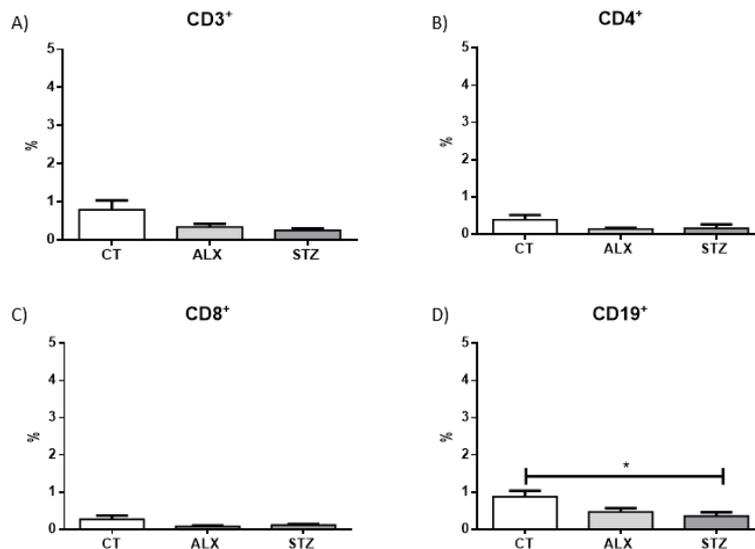
Os linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), tanto do baço quanto do pâncreas, dos animais STZ sofreram redução na sua porcentagem, quando comparado aos animais CT, sem alterações na população de linfócitos T, conforme as Figuras 23 e 24 (Apêndice VI).

Figura 23 – Populações de linfócitos do baço



Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o baço coletado e processado em tampão RPMI, com suas células marcadas com CD11b, CD3, CD4, CD8, CD25 e CD19 e avaliadas por citometria de fluxo. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

Figura 24 – Populações de linfócitos do pâncreas



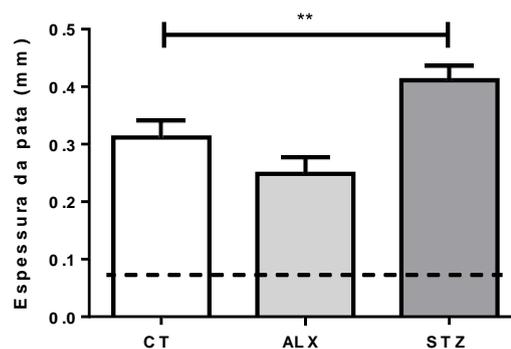
Após o tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias), os animais tiveram o pâncreas coletado e processado em tampão RPMI, com suas células marcadas com CD11b, CD3, CD4, CD8, CD25 e CD19 e avaliadas por citometria de fluxo. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

#### 4.7 Avaliação da resposta imune adaptativa *in vivo*

Para o grupo de animais imunizados previamente com OVA, e posteriormente tratados com os agentes diabetogênicos, foram feitas a avaliação indireta da resposta imunológica adaptativa *in vivo* (Figura 25), e as análises da capacidade proliferativa dos linfócitos *in vitro* (Figura 26) e da produção de anticorpos específicos para OVA (Figura 26).

A avaliação da resposta adaptativa celular *in vivo*, feita através da mensuração do edema formado na pata dos animais CT e diabéticos ALX e STZ, frente ao desafio com OVA, mostrou que, 6 horas após o contato com antígeno, os animais STZ apresentaram um edema maior do que o desenvolvido pelos animais CT, conforme a Figura 25 (Apêndice VII).

Figura 25 – Cinética da resposta imunológica *in vivo* contra OVA

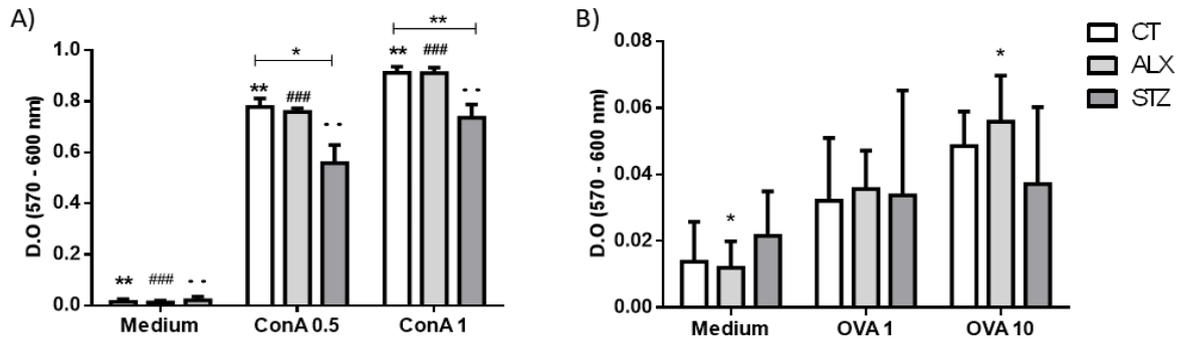


Os animais foram imunizados com 3 doses de 20  $\mu\text{g/mL}$  de OVA em 0, 15 e 30 dias. Após 30 dias, foram submetidos ao tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60 mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias) e então desafiados com 10  $\mu\text{g/mL}$  de OVA no coxim plantar. A espessura da pata foi medida em 0, 6 e 24 horas após a inoculação do antígeno. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M.  $**p < 0,01$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

##### 4.7.1 Avaliação da capacidade proliferativa dos linfócitos *in vitro* em animais imunizados

A capacidade proliferativa dos linfócitos foi testada em cultura celular do baço dos animais imunizados, em cinco condições diferentes, com o Meio (controle), ConA 0,5, e 1  $\mu\text{g/mL}$ , e OVA 1 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Foi constatada redução na capacidade proliferativa dos animais STZ estimulados com ConA 0,5 e 1  $\mu\text{g/mL}$ , comparados aos animais CT. O estímulo OVA não gerou diferenças estatísticas entre animais diabéticos ALX e STZ e os animais CT, conforme a Figura 26 (Apêndice VII).

Figura 26 – Avaliação da capacidade proliferativa de linfócitos em animais imunizados com OVA

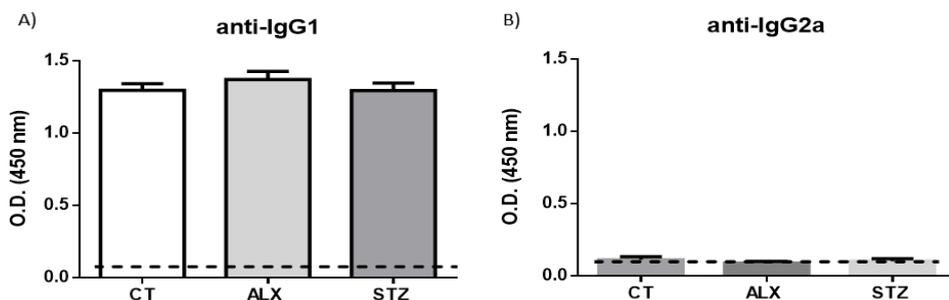


Os animais foram imunizados com 3 doses de 20  $\mu\text{g/mL}$  de OVA em 0, 15, 30 dias. Após 30 dias, foram submetidos ao tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60 mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias) e tiveram o baço coletado e processado em tampão RPMI completo, com linfócitos incubados com Meio, ConA 0,5, ConA 1, OVA 1 e OVA 10  $\mu\text{g/mL}$  por 72 horas, com adição de resazurina 1% em 48 horas, para análise da proliferação celular por espectrofotometria. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla comparação.

#### 4.7.2 Avaliação da produção de anticorpos específicos OVA em animais imunizados

A avaliação da concentração de anticorpos IgG1 e IgG2 específicos para OVA foi realizada no soro dos animais, revelando que a imunização foi bem-sucedida, com polarização para resposta de anticorpos IgG1 e nenhuma diferença estatística dos animais diabéticos ALX e STZ quanto aos CT, conforme a Figura 27 (Apêndice VII).

Figura 27 – Anticorpos anti-Ig1 e anti-IgG2a OVA-específicos



Os animais foram imunizados com 3 doses de 20  $\mu\text{g/mL}$  de OVA em 0, 15, 30 dias. Após 30 dias, foram submetidos ao tratamento com os agentes diabetogênicos (ALX 60 mg/kg 1x dose i.v e STZ 65 mg/kg x5 doses i.p; 15 dias) e tiveram seu sangue coletado, pelo plexo facial, com o soro separado por centrifugação, a 10.000 rpm por 20 min, e avaliada a concentração de anticorpos por densidade óptica em espectrofotometria. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. As diferenças entre os grupos foram testadas com análise de variância (ANOVA - uma via), seguida pelo teste Bonferroni's de múltipla.

## **DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que ambos os agentes diabetogênicos, ALX e STZ, são capazes de alterar parâmetros imunológicos em animais diabéticos induzidos, mas que apenas em animais induzidos com STZ essas alterações se traduzem em diferenças na ativação da resposta imune *in vivo* e *in vitro*.

Os agentes diabetogênicos ALX e STZ são os dois modelos de diabetes químico mais empregados para estudos de DM1 experimental, caracterizados pela destruição das células  $\beta$ , por necrose celular, com o agente ALX causando a morte celular pela produção de ROS e o STZ através da quebra do DNA (LENZEN et al., 2008). Porém, as diferenças entre os agentes não se restringem apenas ao mecanismo de indução, mas também ao nível de toxicidade. Estudos da década de 1970, conduzidos com uso de ALX, por Ptak et al. (1975), e com STZ, por Nichols et al. (1978), mostraram diferentes graus de imunotoxicidade que foram mais explorados em estudos posteriores (DIAB et al., 2015; GAULTON et al., 1985; JANG et al., 2009; LUO et al., 2019; MULLER et al., 2002; NAGIB et al., 2010; NICHOLS et al., 1978; SONG et al., 2006; XIANGYANG et al., 2006; WELLHAUSEN, 1986) e até mesmo questionados quanto à origem da imunotoxicidade (CHATAMRA et al., 1985; LUO et al., 2007; MIC et al., 2007; PAVELIĆ et al., 1978; SINZATO et al., 2020), levando às vezes a um impasse na escolha do agente mais indicado.

A toxicidade dos agentes pode variar dependendo da via e da dose administrada no modelo desejado (MOSTAFAVINIA et al., 2016), com a via intraperitoneal a mais comum quando se observam os estudos da literatura (Figura 3). Entretanto, na indução por ALX, as vias intraperitoneal e subcutânea tendem a exigir doses 2 a 3 vezes mais altas do que a via intravenosa, para terem a mesma efetividade (SZKUDELSKI, 2001), com estudos que usam a via intravenosa para indução com ALX necessitando apenas uma única dose de 60 mg/Kg (AYALA et al., 2019; TESSARO et al., 2020) – o que representa a metade do normalmente utilizado (Figura 3). O uso de STZ, por sua vez, foi padronizado por Like e Rossini (1976), como a via intraperitoneal na dose de 65 mg/kg administrada em 5 doses, sendo a menos tóxica ao animal para indução do DM1, o qual parece ser o priorizado pela literatura (Figura 3).

Uma das vantagens dos agentes diabetogênicos ALX e STZ é que ambos, quando levam ao estabelecimento do diabetes químico, induzem os sintomas clássicos observados em humanos com DM1 (SILVA; NOGUEIRA, 2015). Esse quadro clínico foi reproduzido em nossos animais, que apresentaram aumento do nível de glicose no sangue, perda de peso,

polifagia, polidipsia e poliúria, mostrando-nos que ambos os agentes diabetogênicos foram efetivos na indução do DM1.

A avaliação qualitativa e quantitativa dos elementos celulares do sangue periférico, por meio da análise do hemograma completo, é um bom método para monitorar o estado de saúde do animal, fornecendo informações que nos permitem avaliar alterações sistêmicas do organismo (MACÊDO et al., 2015). As análises hematimétricas realizadas mostraram diminuição da série leucocitária nos valores de leucócitos, linfócitos e porcentagem de linfócitos, nos animais diabéticos de ambos os grupos, e dos monócitos nos animais ALX, quando comparados ao grupo CT. Ademais, houve aumento da porcentagem de granulócitos no grupo ALX comparado ao grupo CT. Os valores dos marcadores para o eritrograma e plaqueteograma não apresentaram alterações significativas, indicando maior sensibilidade das células imunológicas aos agentes diabetogênicos, o que pode estar relacionado aos efeitos tóxicos dos agentes para os órgãos linfoides primários, como demonstrado por Nichols et al. (1981), para a ALX, Wellhausen (1986), para a STZ, na medula óssea, e por Barreto et al. (2005), Nagib et al. (2010), por ALX, e Ozerkan et al. (2014), Wellhausen (1986), por STZ, no timo – e que foram confirmados por nossos resultados.

A partir da avaliação hematimétrica, é possível calcular a RNL e a RPL, que são propostas como marcadores indiretos de inflamação em pacientes diabéticos (ATAK et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018; XU et al., 2017; WELLHAUSEN, 1986; YANG et al., 2018) e oferecem um parâmetro indireto da regulação imunológica do indivíduo, uma vez que os neutrófilos são células inflamatórias potentes e as plaquetas auxiliam na modulação de reações inflamatórias e na condução da resposta imune. As razões RNL e RPL estão aumentadas nos grupos diabéticos comparadas ao grupo CT, o que se deve ao desvio do leucograma para número maior de neutrófilos (calculado a partir dos valores dos granulócitos) e menor de linfócitos, porém, sem um valor clínico evidenciado, dado que todos os grupos se mantiveram dentro dos valores de referência para as análises hematimétricas feitas (CHARLES RIVER, 2011; SANTOS et al., 2016), mas mostrando uma tendência à inflamação, que esses animais poderiam manifestar caso fossem submetidos a maior tempo de evolução da doença, sem nenhum tratamento.

A toxicidade direta para os órgãos linfoides primários, proposta na literatura por ação dos agentes, foi confirmada em nossos achados de alterações na proporção de linfócitos e neutrófilos na medula óssea de animais tratados com STZ, reforçando a conclusão da toxicidade desse agente sugerida por Wellhausen (1986), que demonstrou que a capacidade de STZ em causar supressão endógena de DNA em células recém-isoladas da medula óssea de

animais saudáveis não é dependente da deficiência da insulina. Além disso, a diminuição no número e na porcentagem de linfócitos, no sangue total, e na porcentagem de linfócitos T, no timo, e B, no baço e no pâncreas, e o aumento na porcentagem de granulócitos, no sangue dos animais diabéticos do grupo STZ, podem ser um reflexo desse efeito na redução dos linfócitos e no aumento dos neutrófilos na medula óssea dos animais tratados com STZ, o que também justificaria, em partes, a atrofia da região medular do timo observada nesse grupo. A ALX também é conhecida por exercer efeitos diretos nas células eritropoéticas da medula óssea, conforme descritos por Baiardi (1955). Porém essas alterações não são duradouras e os parâmetros tendem a voltar ao estado normal após 7 dias do tratamento, por meio de ajustes compensatórios que se desenvolvem para reparar os danos, razão pela qual acreditamos não termos encontrado alterações significantes o suficiente para uma diferença estatística dos animais induzidos com ALX, quando comparados aos animais CT. Achados semelhantes foram encontrados nos resultados de caracterização por citometria de fluxo da população de eosinófilos e das subpopulações de linfócitos na medula óssea de animais induzidos com ALX, em estudos realizados por Ferreira et al. (2020).

Outra forma de avaliar possíveis efeitos dos agentes diabetogênicos, sobre o ambiente imunológico do animal, é dosando a concentração de citocinas em órgãos como baço e pâncreas, que sejam associadas ao perfil inflamatório, como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17, ou anti-inflamatório, IL-4 e IL-10, que apresentam papel-chave na fisiopatologia do modelo DM1 autoimune (ALNEK et al., 2015; KENEFECK et al., 2015; VASEGHI et al., 2016; WAUGH et al., 2017), mas que, em condições naturais, são expressas em nível basal (SMITH; HUMPHRIES, 2009). Embora a indução química do DM1 não desencadeie uma resposta imunológica do tipo autoimune no animal, é interessante saber se, de alguma forma, esses agentes poderiam afetar essa homeostasia constitucional das citocinas avaliadas.

Em nossos experimentos, os níveis basais de citocinas dos homogenatos do baço e do pâncreas foram pouco alterados, com apenas uma redução discreta na expressão de IL-6, no baço, e IL-1 $\beta$ , no pâncreas, dos animais diabéticos STZ relativos ao CT. É mais provável que tal achado seja um efeito do ambiente hiperglicêmico do DM1 sobre estímulos de expressão de citocinas do macrófago – como mostrados nos estudos de Hill et al. (1998) e sugerido nos estudos de Anupam et al. (2018), no comprometimento dos linfócitos T regulador de ratos diabéticos induzidos com STZ, causado pelo estado inflamatório – do que um efeito direto dos agentes. Ademais não houve diferença estatística para nenhuma outra citocina nos grupos diabéticos, indicando que os agentes ALX e STZ não interferem na integridade da expressão

basal das citocinas avaliadas, tomando-se por referência os valores de expressão dos animais saudáveis do grupo CT.

O monitoramento da capacidade proliferativa de linfócitos dos animais induzidos com ALX e STZ, mensurada *in vitro* em resposta a estímulos mitogênicos, representa bom parâmetro para avaliação do estado funcional de resposta dessas células. Para descobrir se a indução do diabetes com os agentes diabetogênicos produziram algum efeito sobre a capacidade proliferativa dos linfócitos T dos animais tratados, estimulamos os linfócitos do baço dos animais com Con A. Em nossos resultados, não foi verificada nenhuma diferença na proliferação dessas subpopulações de linfócitos, avaliados por citometria de fluxo, diferentemente do que se verifica nos resultados do ensaio metabólico da atividade dos linfócitos por *Alamar blue*, nos animais imunizados, em que houve comprometimento na ativação dos linfócitos dos animais induzidos com STZ, quando estimulados por ConA 0,5 µg/mL e 1 µg/mL, os quais podem estar relacionados à alterações na função mitocondrial e no metabolismo dessas células, identificadas no estudo de Anupam et al., (2018), realizado em ratos diabéticos induzidos com STZ. Essa imunotoxicidade, para ativação e proliferação dos linfócitos de animais induzidos com STZ, é um achado descrito em vários estudos (BADR, 2013; GAULTON et al., 1985; JANG et al., 2009; NICHOLS et al., 1978), o que demonstra que esse é um efeito recorrente do agente, causado em diferentes espécies e protocolos de indução.

Em nossas avaliações das diferentes subpopulações dos linfócitos T em seus locais de maturação (timo), ativação (baço) e função (pâncreas), verificamos redução na porcentagem dos linfócitos totais CD3<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) e duplo positivo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no timo de animais tratados com STZ, com resultados semelhantes aos descritos por Luo et al. (2007). Esses autores, contudo, analisam como sendo alterações decorrentes do ambiente hiperglicêmico e não devido à toxicidade de STZ para esse órgão, o que de fato pode influenciar na resposta imune e nas dinâmicas celulares (JAFAR et al., 2015), mas que entendemos que mais provável seja como sendo um reflexo dos nossos achados, pois ambos os nossos grupos diabéticos induzidos se encontravam em ambiente hiperglicêmico, mas apresentaram alterações distintas, e considerando os estudos de Muller et al., (2011) de que o STZ, como um análogo da molécula de glicose, pode ser captado eventualmente pelos linfócitos por outros transportadores de glicose como o GLUT1 na sua dependência de glicose, e que pode ser relacionado com as alterações nas subpopulações de linfócitos do sangue e baço.

Os animais cujo a diabetes foi induzida com ALX apresentaram alterações como aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, bem como linfócito B (CD19<sup>+</sup>), que têm sua presença no timo relacionada à promoção da tolerância em células T (LUO et al., 2019). A associação dessas alterações com o ambiente hiperglicêmico seria mais coerente se considerássemos que, em condições normais de diabetes, o ambiente hiperglicêmico é associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e estresse (BADR et al., 2013), levando ao aumento das T CD8<sup>+</sup>, envolvidas no processo de insulite (YAOCHITE et al., 2013). Além disso, foi observada, em nossos resultados, a redução dos linfócitos B CD19<sup>+</sup> no baço e no pâncreas dos animais com diabetes induzida por STZ, o que pode ser atribuída à maior sensibilidade dessas células ao agente STZ, conforme demonstrado *in vitro* por Muller et al. (2011), e que apresenta um dado novo para literatura ao demonstrar esse efeito *in vivo*.

As análises histológicas da integridade da estrutura de timo, baço e pâncreas nos proporcionam uma visão macro dos efeitos citotóxicos que os agentes exercem na população de células residentes e constituintes desses órgãos. Nossa avaliação demonstrou que, dos órgãos linfoides, o baço não apresentou nenhuma alteração. Já o timo sofreu atrofia da região medular, após o tratamento de ambos os agentes, o que é um achado descrito tanto em animais induzidos com ALX (BARRETO et al., 2005; NAGIB et al., 2010), como com STZ (OZERKAN et al., 2014; WELLHAUSEN, 1986). Animais cujo diabetes foi induzido com ALX apresentaram também a diminuição da quantidade de células retículo-epiteliais e da morte de linfócitos/timócitos e o aumento na presença de corpúsculo de Hassall, mostrando alteração no componente epitelial do timo e no processo natural de substituição dos linfócitos/timócitos (ELMORE, 2006). Embora o timo dos animais tratados com ALX tenha apresentado mais alterações, isso não se refletiu na população de linfócitos e sua efetividade, como nossos resultados demonstram, reforçando a suspeita de que a hiperglicemia *per se* não é responsável pelas alterações encontradas nos animais STZ e que isso se deva mais a um efeito tóxico direto do agente na população dessas células. O pâncreas, por sua vez, é o órgão-alvo dos agentes diabetogênicos; portanto, a presença de atrofia das ilhotas de Langerhans, de infiltração inflamatória e de hiperemia com dilatação vascular é um achado comum e esperado que indica a destruição efetiva das células β do pâncreas, com processo inflamatório e consequente mudanças estruturais do órgão (XIANGYANG et al., 2006).

Enquanto a avaliação *in vitro* da capacidade proliferativa oferece uma forma de avaliar os linfócitos quanto a sua ativação em condições controladas, a avaliação *in vivo* permite avaliá-los quanto a sua funcionalidade no organismo. Para tanto, nós induzimos uma resposta adaptativa contra a OVA em todos os grupos de animais durante sua fase saudável e,

posteriormente, induzimos o DM1 com ALX e STZ, para que, desse modo, fosse possível testar se o animal que tivesse montado uma resposta adaptativa em seu estado saudável, poderia apresentar, posteriormente, algum comprometimento na fase efetora da resposta contra o antígeno, decorrente do tratamento com os agentes diabetogênicos.

Para avaliação da resposta imune *in vivo*, os animais foram imunizados com OVA preparada com adjuvante esqualeno, devido a restrição do uso dos adjuvantes de Freund completo e incompleto, determinada na resolução normativa CONCEA nº 33 (BRASIL, 2016). Ao testar a resposta imune adaptativa, pelo teste de hipersensibilidade, verificamos que os animais desenvolveram um edema de pata considerado fraco, mas foram eficientes em montar uma resposta adaptativa humoral contra a OVA. Vale ressaltar que o fato de termos uma resposta de perfil humoral e não mediada por células pode estar relacionado à escolha do adjuvante esqualeno, que tem a capacidade de desencadear hipersensibilidade mediada por imunocomplexos (ASA et al., 2002) – o que de fato foi observado em nosso ensaio. O edema mais proeminente nos animais STZ à OVA, quando comparado ao grupo CT, mostra o aumento na intensidade da resposta, que pode ter relação com o desbalanço na proporção de neutrófilos e linfócitos, o que constatamos na medula e no sangue periférico desses animais, com maior porcentagem de neutrófilos, que participam da hipersensibilidade mediada por imunocomplexos (LI et al., 2016). Além disso, os tipos de populações celulares envolvidos nessa resposta pertencem a linhagem mieloide, o que justifica o aumento da intensidade dessa resposta nos animais induzidos com STZ, mesmo em detrimento dos mesmos terem apresentado alterações de comprometimento na ativação dos seus linfócitos testados *in vitro*.

Dessa forma, podemos observar que as alterações causadas nos animais diabéticos induzidos com ALX e STZ se refletem em diferentes níveis da imunocompetência dos animais, como podemos atestar nas maiores mudanças dos animais induzidos com STZ nas avaliações *in vitro* e *in vivo*, que podem ter relação com a capacidade compensatória natural do organismo dos animais induzidos com ALX, em reparar os danos causados pelo agente, como sugerido por Baiardi (1955), mas que falham nos animais induzidos com STZ, justamente pela maior toxicidade desse agente para os órgãos linfoides. Porém, mais estudos são necessários para explorar como isso acontece.

**CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

Concluimos que ambos os agentes, ALX e STZ, influenciaram a dinâmica dos órgãos linfoides e suas populações celulares, mas que o impacto disso só se reflete em alterações no comportamento da resposta imune *in vivo* e *in vitro* de animais induzidos com STZ.

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A., BAKERY, H. H., ALLAM, G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 287-292, 2018.
- AHMED, S. A., GOGAL JR, R. M., WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- ALNEK, K., KISAND, K., HEILMAN, K., et al. Increased Blood Levels of Growth Factors, Proinflammatory Cytokines, and Th17 Cytokines in Patients with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0142976, 2015.
- ANUPAM, K., KAUSHAL, J., PRABHAKAR, N., BHATNAGAR, A. Effect of redox status of peripheral blood on immune signature of circulating regulatory and cytotoxic T cells in streptozotocin induced rodent model of type I diabetes. **Immunobiology**, v. 223, n. 10, p. 586-597, 2018.
- ASA, P. B., WILSON, R. B., GARRY, R. F. Antibodies to squalene in recipients of anthrax vaccine. **Experimental and molecular pathology**, v. 73, n. 1, p. 19-27, 2002.
- ASMAT, U., ABAD, K., ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.
- ATAK, B., AKTAS, G., DUMAN, T. T., et al. Diabetes control could through platelet-to-lymphocyte ratio in hemograms. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 65, n. 1, p. 38-42, 2019.
- AYALA, T. S., TESSARO, F. H. G., JANNUZZI, G. P., BELLA, L. M., FERREIRA, K. S., MARTINS, J. O. High Glucose Environments Interfere with Bone Marrow-Derived Macrophage Inflammatory Mediator Release, the TLR4 Pathway and Glucose Metabolism. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- BADR, G. Blocking type I interferon signaling rescues lymphocytes from oxidative stress, exhaustion, and apoptosis in a streptozotocin-induced mouse model of type I diabetes. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.
- BAIARDI, J. C. Some effects of alloxan on hemopoiesis in the mouse. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 183, n. 2, p. 209-213, 1955.
- BANTING, F. G., BEST, C. H., COLLIP, J. B., et al. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 12, n. 3, p. 141, 1922.
- BARNETT, R. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p.195, 2018.
- BARRETO, E. O., RIEDERER, I., ARANTES, A. C. S., CARVALHO, V. F., FARIAS-FILHO, F. A., CORDEIRO, R. S. B., SAVINO, W. Thymus involution in alloxan diabetes: analysis of mast cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 127-130, 2005.

BRASIL. Resolução normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016. Procedimentos – roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, p. 62. 2016.

BROWN, D. M., YUNIS, E. J., FERNANDES, G. T-cell function in diabetic mice. In: FEDERATION PROCEEDINGS. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814- 3998 USA: **FEDERATION AMER SOC EXP BIOL**, p. 1258-1258, 1977.

BOLLIGER, A. P. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. **Veterinary clinical pathology**, v. 33, n. 2. P.58-67. 2004.

BURRACK, A. L., MARTINOV, T., FIFE, B. T. T cell-mediated beta cell destruction: autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes. **Frontiers in endocrinology**, v. 8, 2017.

CARVALHO, C., FERREIRA, B. B., GRILO, C. S. P., et al. Perfil glicêmico de ratos diabéticos aloxano-induzidos tratados com *Momordica charantia* L. **Revista Ciência e Saúde On-line**, v. 1, n. 1, 2016.

CHARLES RIVER laboratories international. **C57BL/6 mice**. Research model. North American, 2011.

CHATAMRA, K., DANIEL, P. M., KENDALL, M. D., et al. Atrophy of the thymus in rats rendered diabetic by streptozotocin. **Hormone and metabolic research**, v. 17, n. 12, p. 630-632, 1985.

CHEN, T., GAO, J., XIANG, P., et al. Protective effect of platycodin D on liver injury in alloxan-induced diabetic mice via regulation of Treg/Th17 balance. **International immunopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 338-348, 2015.

CORREA, J. D., NÚÑEZ, E. M., FUENTES. M. M., et al. Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Journal of diabetes research**, v. 2015, 2015.

DATTATREYA, A. SARANGI, T. K. A Review on Diabetes Mellitus: Complications, Management and Treatment Modalities. **Journal of Medical and Health Sciences**. V. 4, n.3, 2015.

DEEPTHI, B., SOWJANYA, K., LIDIYA, B., et al. A modern review of diabetes mellitus: an annihilatory metabolic disorder. **Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology**, v. 3, n. 1, 2017.

DESHMUKH, C. D., JAIN, A. Diabetes Mellitus: A Review. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 3, p. 224-230, 2015.

DIAB, R. A. H., FARES, M., ABEDI-VALUGERDI, M., et al. Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan: in vitro and in vivo studies. **Immunology letters**, v. 163, n. 2, p. 193-198, 2015.

DIMEGLIO, L. A., EVANS-MOLINA, C., ORAM, R. A. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 391, n. 10138, p. 2449-2462, 2018.

- ELMORE, S. A. Enhanced histopathology of the thymus. **Toxicologic pathology**, v. 34, n. 5, p. 656-665, 2006a.
- ELMORE, S. A. Enhanced histopathology of the spleen. **Toxicologic pathology**, v. 34, n. 5, p. 648-655, 2006b.
- FEDERIUK, I. F., CASEY, H. M., QUINN, M. J., et al. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. **Comparative medicine**, v. 54, n. 3, p. 252-257, 2004.
- FERREIRA, S. S., OLIVEIRA, M. A., TSUJITA, M., NUNES, F. P., CASAGRANDE, F. B., GOMES, E., RUSSO, M., LIMA, W. T., MARTINS, J. O. Insulin Modulates the Immune Cell Phenotype in Pulmonary Allergic Inflammation and Increases Pulmonary Resistance in Diabetic Mice. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 84, 2020.
- FIRST of her name. Direction: Michelle MacLaren. Production: David Benioff; D.B. Weiss. Performer: Emilia Clarke. Screenplay: David Benioff; D.B. Weiss. Photograph by Robert McLachlan. Game of Thrones recording. USA: HBO entertainment, 2014. DVD.
- FURMAN, B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Current protocols in pharmacology**, p. 5.47. 1-5.47. 20, 2015.
- GAGLIA, J. L., HARISINGHANI, M., AGANJ, I., et al. Noninvasive mapping of pancreatic inflammation in recent-onset type-1 diabetes patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 7, p. 2139-2144, 2015.
- GAULTON, G. N., SCHWARTZ, J. L., EARDLEY, D. D. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. **Diabetologia**, v. 28, n. 10, p. 769-775, 1985.
- GUIMARÃES, J. P. T., FILGUEIRAS, L. R., MARTINS, J. O., et al. Leukotriene Involvement in the Insulin Receptor Pathway and Macrophage Profiles in Muscles from Type 1 Diabetic Mice. **Mediators of inflammation**, v. 2019, 2019.
- HILL, J. R., KWON, G., MARSHALL, C. A. et al. Hyperglycemic levels of glucose inhibit interleukin 1 release from RAW 264.7 murine macrophages by activation of protein kinase C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3308-3313, 1998.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF **Diabetes Atlas**, 9<sup>th</sup> edn. Brussels. Belgium. International Diabetes Federation, p. 17-39, 2019.
- ISLAM, M., CODE, Q. Streptozotocin is more convenient than Alloxan for the induction of Type 2 diabetes. **IJPR**, v. 7, n. 01, 2017.
- JANG, S. M., YEE, S. T., CHOI, J., CHOI, M. S., DO, G. M., JEON, S. M., LEE, M. K. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic  $\beta$ -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 113-119, 2009.

JAFAR, N., EDRISS, H., NUGENT, K. The effect of short-term hyperglycemia on the innate immune system. **The American journal of the medical sciences**, v. 351, n. 2, p. 201-211, 2016.

KARAMANO, M., PROTOGEROU, A., TSOUCALAS et al., Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. **World journal of diabetes**, v. 7, n. 1, p. 1, 2016.

KENEFECK, R., WANG, C. J., KAPADI, T. et al. Follicular helper T cell signature in type 1 diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 1, p. 292-303, 2015.

KHARROUBI, A. T., DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 6, p. 850, 2015.

KUHN, C., BESANCON, A., LEMOINE, S., et al. Regulatory mechanisms of immune tolerance in type 1 diabetes and their failures. **Journal of autoimmunity**, v. 71, p. 69-77, 2016.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LIKE, A. A., ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science**, v. 193, n. 4251, p. 415-417, 1976.

LI, J. L., LIM, C. H., TAY, F. W., GOH, C. C., DEVI, S., MALLERET, B., TANIZAKI, H. Neutrophils self-regulate immune complex-mediated cutaneous inflammation through CXCL2. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 2, p. 416-424, 2016.

LUO, B., CHAN, W. F. N., LORD, S. J., NANJI, S. A., RAJOTTE, R. V., SHAPIRO, A. M. J., ANDERSON, C. C. Diabetes induces rapid suppression of adaptive immunity followed by homeostatic T-cell proliferation. **Scandinavian journal of immunology**, v. 65, n. 1, p. 22-31, 2007.

LUO, Z., SOLÄNG, C., MEJIA-CORDOVA, M., THORVALDSON, L., BLIXT, M., SANDLER, S., SINGH, K. Kinetics of immune cell responses in the multiple low-dose streptozotocin mouse model of type 1 diabetes. **FASEB BioAdvances**, v. 1, n. 9, p. 538-549, 2019.

MACÊDO, L. B., PIMENTEL, M. M. L., DOS SANTOS, F. A., et al. A eritropoiese e o eritrograma: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 9, n. 4, p. 716-732, 2015.

MIC, A. A., MIC, F. A., TATU, C. A., IONAC, M., ORDODI, V. L., PAUNESCU, V. Indomethacin inhibits thymic involution in mice with streptozotocin-induced diabetes. **Comparative medicine**, v. 57, n. 5, p. 476-481, 2007.

MINKOWSKI, O. Designer of experimental diabetes. **Journal of the American Medical Association**, v. 199, n.10, 1967.

MOSTAFAVINIA, A., AMINI, A., GHORISHI, S. K. et al. The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type 1 diabetes

- mellitus and mortality rate in rats. **Laboratory animal research**, v. 32, n. 3, p. 160-165, 2016.
- MULLER, A., SCHOTT-OHLY, P., DOHLE, C., GLEICHMANN, H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. **Immunobiology**, v. 205, n. 1, p. 35, 2002.
- MULLER, Y. D., GOLSHAYAN, D., EHIRCHIOU, D., et al. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. **Diabetes**, v. 60, n. 9, p. 2331-2340, 2011.
- NAGIB, P. R., GAMEIRO, J., STIVANIN-SILVA, L. G., DE ARRUDA, M. S. P., VILLA-VERDE, D. M. S., SAVINO, W., VERINAUD, L. Thymic microenvironmental alterations in experimentally induced diabetes. **Immunobiology**, v. 215, n. 12, p. 971-979, 2010.
- NICHOLS, W. K., VANN, L. L., SPELLMAN, J. B. Streptozotocin effects on T lymphocytes and bone marrow cells. **Clinical and experimental immunology**, v. 46, n. 3, p. 627, 1981.
- NICHOLS, W. K., SPELLMANN, J. B., DAYNES, R. A. Immune responses of diabetic animals. Comparison of genetically obese and streptozotocin-diabetic mice. **Diabetologia**, v. 14, n. 5, p. 343-349, 1978.
- NUNES, R. Citocinas de resposta Th1 e Th2 e diabetes mellitus tipo. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 49, n. 4, p. 359-64, 2017.
- OLIVEIRA, A. C. R., MENDES, B. B., DE ALCÂNTARA, K. C. Neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratios in diabetic patients with or without renal dysfunction. **Scientia Medica**, v. 28, n. 3, p. 30376, 2018.
- OZERKAN, D., OZSOY, N., CEBESYOY, S. Response of thymus lymphocytes to streptozotocin-induced diabetes and exogenous vitamin C administration in rats. **Journal of Electron Microscopy**, v. 63, n. 6, p. 409-417, 2014.
- PAVELIĆ, K., SLIJEPIĆEVIĆ, M., PAVELIĆ, J. Recovery of immune system in diabetic mice after treatment with insulin. **Hormone and Metabolic Research**, v. 10, n. 05, p. 381-386, 1978.
- PALLAVICINI, M. G., NICHOLS, W. K. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by factor (s) in alloxan-diabetic rat plasma. **Diabetes**, v. 25, n. 7, p. 614-622, 1976.
- PIERO, M. N., NZARO, G. M., NJAGI, J. M. Diabetes mellitus- a devastating metabolic disorder. **Asian journal of biomedical and pharmaceutical sciences**, v. 5, n. 40, p. 1, 2015.
- PTAK, W., CZARNIK, Z., HANCZAKOWSKA, M. A. R. I. A. Contact sensitivity in alloxan-diabetic mice. **Clinical and experimental immunology**, v. 19, n. 2, p. 319, 1975.
- PUGLIESE, A. Autoreactive T cells in type 1 diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 8, p. 2881-2891, 2017.

QUAH, B. J., WARREN, H. S., PARISH, C. R. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2049, 2007.

RADENKOVIĆ, M., STOJANOVIĆ, M., PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 78, p. 13-31, 2016.

RITU, L. The History of Diabetes Mellitus. **Sultan Qaboos University Med J**, v. 13, n. 3, pp. 368-370, 2013.

ROEP, B. O., TREE, T. I. Immune modulation in humans: implications for type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 4, p. 229, 2014.

ROHILLA, A., ALI, S. Alloxan induced diabetes: mechanisms and effects. **International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences**, v. 3, n. 2, p. 819-823, 2012.

SAKAGUCHI, S., VIGNALI, D. A., RUDENSKY, A. Y. et al. The plasticity and stability of regulatory T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 461, 2013.

SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M., KOCBUCH, K., GRDEN, M., et al. Diabetes-induced decrease of adenosine kinase expression impairs the proliferation potential of diabetic rat T lymphocytes. **Immunology**, v. 118, n. 3, p. 402-412, 2006.

SANTOS, E. W., DE OLIVEIRA, D. C., HASTREITER, A., et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

SHARPEY-SCHÄFER, E. A. An introduction to the Study of the endocrine glands and internal secretions: lane medical lectures, **Stanford University Press**, n. 8, p. 5-114, 1913.

SINZATO, Y. K., GELALETI, R. B., VOLPATO, G. T. et al. Streptozotocin-induced leukocyte DNA damage in rats. **Drug and chemical toxicology**, p. 1-4, 2018

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes** 2019-2020. São Paulo: Clannad, 2020. Cap. 1. p. 12-20.

SONG, F., CHEN, W., JIA, W., YAO, P., NUSSLER, A. K., SUN, X., LIU, L. A natural sweetener, *Momordica grosvenori*, attenuates the imbalance of cellular immune functions in alloxan-induced diabetic mice. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 20, n. 7, p. 552-560, 2006.

SOUSA, A. A., ALBERNAZ, A. C., SOBRINHO, H. M. R. Diabetes Mellito tipo 1 autoimune: aspectos imunológicos. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 53-65, 2016.

SHAH, R., SUBHAN, F., SULTAN, S. M., ALI, G., ULLAH, I., ULLAH, S. Comparative evaluation of pancreatic histopathology of rats treated with olanzapine, risperidone and streptozocin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 54, n. 3. 2018.

SILVA, V. D., NOGUEIRA, R. M. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.

SILVA, V. D., NOGUEIRA, R. M. B., OLIVEIRA, G. I. V., et al. Comparação da indução do Diabetes mellitus com Aloxana em diferentes doses em ratos Wistar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, 2014.

SMITH, A. J., HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 1, p. 43-59, 2009.

SZABLEWSKI, L. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. **International immunopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 182-191, 2014.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TAN, T., XIANG, Y., CHANG, C., et al. Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 47, n. 2, p. 234-243, 2014.

TESSARO, F. H. G., AYALA, T. S., BELLA, L. M., MARTINS, J. O. Macrophages from a type 1 diabetes mouse model present dysregulated PI3K/AKT, ERK 1/2 and SAPK/JNK levels. **Immunobiology**, p. 151879, 2019.

VAN-BELLE, T. L., COPPIETERS, K. T., VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological reviews**, v. 91, n. 1, p. 79- 118, 2011.

VASEGHI, H., JADALI, Z. Th1/Th2 cytokines in Type 1 diabetes: Relation to duration of disease and gender. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 20, n. 3, p. 312, 2016.

VIKRAM, A., TRIPATHI, D. N., RAMARAO, P. et al. Evaluation of streptozotocin genotoxicity in rats from different ages using the micronucleus assay. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 49, n. 3, p. 238-244, 2007.

WAUGH, K., SNELL-BERGEON, J., MICHELS, A. et al. Increased inflammation is associated with islet autoimmunity and type 1 diabetes in the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). **PLoS one**, v. 12, n. 4, p. e0174840, 2017.

WELLHAUSEN, S. R. Definition of streptozocin toxicity for primary lymphoidal tissues. **Diabetes**, v. 35, n. 12, p. 1404-1411, 1986.

WU, J., YAN, L. J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 8, p. 181, 2015.

XIANGYANG, Q., WEIJUN, C., LIEGANG, L., PING, Y., BIJUN, X. Effect of a *Siraitia grosvenori* extract containing mogrosides on the cellular immune system of type 1 diabetes mellitus mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 50, n. 8, p. 732-738, 2006.

XU, T., WENG, Z., PEI, C., et al. The relationship between neutrophil-to-lymphocyte ratio and diabetic peripheral neuropathy in Type 2 diabetes mellitus. **Medicine**, v. 96, n. 45, 2017.

YANG, G., YAN, R., TONG, H., et al. Chronic oscillating glucose challenges disarrange innate immune homeostasis to potentiate the variation of neutrophil–lymphocyte ratio in rats with or without hidden diabetes mellitus. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity:Targets and Therapy**, v. 11, p. 277, 2018.

YANG, M., BÜSCHE, G., GANSER, A., LI, Z. Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects. **Annals of hematology**, v. 92, n 5. p. 587-594, 2013.

YAOCHITE, J. N. U., CALIARI-OLIVEIRA, C., DAVANSO, M. R., CARLOS, D., MALMEGRIM, K. C. R., DE BARROS CARDOSO, C. R., COVAS, D. T. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. **Immunobiology**, v. 218, n. 3, p. 338-352, 2013.

YAKHCHALIAN, N., MOHAMMADIAN, N., HATAMI, K. et al., Hematological and Serum Biochemical Analysis of Streptozotocin-Induced Insulin Dependent Diabetes Mellitus in Male Adult Wistar Rats. **bioRxiv**, p. 359844, 2018.



## ANEXO I

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
 Documento sem validade oficial

## FICHA DO ALUNO

9142 - 10655351/1 - Luiz Adriano Damasceno de Queiroz

Email: luizadriano@usp.br  
 Data de Nascimento: 09/04/1995  
 Cédula de Identidade: RG - 7154995 - PA  
 Local de Nascimento: Estado do Pará  
 Nacionalidade: Brasileira  
 Graduação: Bacharel em Biomedicina - Universidade do Estado do Pará - Pará - Brasil - 2018

Curso: Mestrado  
 Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
 Área: Fisiopatologia  
 Data de Matrícula: 14/08/2018  
 Início da Contagem de Prazo: 14/08/2018  
 Data Limite para o Depósito: 15/02/2021  
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Joilson de Oliveira Martins - 14/08/2018 até o presente. Email: martinsj@usp.br  
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 14/08/2018  
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 04/09/2019  
 Data do Depósito do Trabalho:  
 Título do Trabalho:  
 Data Máxima para Aprovação da Banca:  
 Data de Aprovação da Banca:  
 Data Máxima para Defesa:  
 Data da Defesa:  
 Resultado da Defesa:  
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 14/08/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 28/01/2020

Impresso em: 17/06/2020 12:02:22



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

9142 - 10655351/1 - Luiz Adriano Damasceno de Queiroz

Síglas	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMI5863-9/2	Seminário Didático-Científico em Imunologia II (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/08/2018	29/11/2018	60	4	90	A	N	Concluída
BMB5817-2/4	Fisiopatologia do Diabetes Mellitus (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/09/2018	17/10/2018	60	4	100	A	N	Concluída
BMI5898-1/3	O Ensino de Imunologia para Cursos de Graduação (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	10/10/2018	29/11/2018	120	8	88	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0519 "Imunodiagnóstico", ministrada aos alunos de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	01/02/2019	28/06/2019	-	3	-	-	-	-
FBC5793-14/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	12/03/2019	24/06/2019	15	1	88	A	N	Concluída
FBC5757-8/3	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	06/08/2019	18/11/2019	15	1	75	B	N	Concluída
Crédito Externo	Disciplina cursada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (2)	25/11/2019	27/11/2019	-	2	100	T	-	-
FBC5954-1/4	Redação de Trabalhos Científicos	04/03/2020	10/03/2020	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5722-5/3	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	11/05/2020	31/05/2020	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
<b>Total:</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>28</b>

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

**Observações:**

- 1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588/05, alterada pelas Portarias GR-4391/09 e GR-4601/09 - PAE e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/06/2020.
- 2) Disciplinas(s) cursada(s) na(o) Escola Paulista de Medicina. Atribuição de créditos aprovada pelo(a) Comissão de Pós-Graduação em Sessão de 11/03/2020.

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 28/01/2020

Impresso em: 17/06/2020 12:02:22

## ANEXO II



## Luiz Adriano Damasceno de Queiroz

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6202415755667664>

ID Lattes: **6202415755667664**

Última atualização do currículo em 03/04/2020

Graduado em Biomedicina pela Universidade do Estado do Pará (UEPA), com habilitação em Análises Clínicas (2014-2018), estágio de iniciação científica no Instituto Evandro Chagas (IEC) no laboratório de imunopatologia experimental da seção de arbovirologia e febres hemorrágicas (SAARB) (2016-2017), cursando mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) no laboratório de imunoendocrinologia. **(Texto informado pelo autor)**

### Identificação

<b>Nome</b>	Luiz Adriano Damasceno de Queiroz
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	QUEIROZ, L. A. D.
<b>Lattes iD</b>	<a href="http://lattes.cnpq.br/6202415755667664">http://lattes.cnpq.br/6202415755667664</a>

### Endereço

<b>Endereço Profissional</b>	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Rua Corinto Vila Indiana 05586060 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (91) 9132461208.
------------------------------	---

### Formação acadêmica/titulação

<b>2018</b>	Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7), Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Estudo comparativo da atividade de linfócitos T em camundongos saudáveis e diabéticos. Orientador:  Joilson de Oliveira Martins. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Aloxana; Estreptozotocina. Grande área: Ciências da Saúde
<b>2014 - 2018</b>	Graduação em Biomedicina. Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil. Título: CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO ENDOTELIAL E SUA RELAÇÃO COM CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS NO PARÊNQUIMA HEPÁTICO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS DA ESPÉCIE Saimiri sp. INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS DA FEBRE AMARELA. Orientador: Milene Silveira Ferreira.
<b>2011 - 2013</b>	Ensino Médio (2º grau). grupo futuro educacional, G%20F%20E, Brasil.

### Formação Complementar

<b>2020 - 2020</b>	?Espectrometria de massas aplicada à análise de metabólitos naturais - inst. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
<b>2019 - 2019</b>	Curso de Imunosenescência. (Carga horária: 30h). Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.

2018 - 2019	Extensão universitária em Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2018 - 2018	V Curso de Férias em Imunologia. (Carga horária: 42h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2018 - 2018	Produção Oral: comunicações acadêmicas. (Carga horária: 32h). Núcleo de Línguas da UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, USP, Brasil.
2016 - 2016	Genética Aplicada À Toxicologia. (Carga horária: 2h). Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.
2015 - 2015	Extensão universitária em No Dia das Mães, Doe amor e vida! Doe Sangue!. (Carga horária: 28h). Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.
2015 - 2015	Terapia Ortomolecular. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista, UNESP, Brasil.
2014 - 2014	Curso de Capacitação em Manejo Clínico da Raiva Humana. (Carga horária: 8h). Prefeitura Municipal de Marabá, PMM, Brasil.
2011 - 2011	SEGURANÇA EM LABORATÓRIO. (Carga horária: 6h). Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.

## Atuação Profissional

---

Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.

### Vínculo institucional

2017 - 2017

### Outras informações

Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20  
Estágio supervisionado em análises clínicas realizado nos laboratórios da Universidade do Estado do Pará, nos setores de bioquímica, hematologia, parasitologia, urianálise, microbiologia e imunologia.

Instituto Evandro Chagas, IEC, Brasil.

### Vínculo institucional

2017 - 2018

### Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário- PIBIC/IEC/FAPESPA, Carga horária: 20  
Atuou no laboratório de Imunopatologia Experimental - Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas - (SAARB)- trabalhando com alterações imunoistopatológicas hepáticas decorrentes da infecção humana por arbovírus.

Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, FSCMP, Brasil.

### Vínculo institucional

2018 - 2018

### Outras informações

Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20  
Estágio supervisionado em análises clínicas realizado nos laboratórios da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, trabalhando em rotina hospitalar nos setores de bioquímica, hematologia, parasitologia, urianálise, microbiologia e imunologia.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

### Vínculo institucional

2018 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno bolsista de mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

## Projetos de pesquisa

---

2018 - Atual

Estudo comparativo da atividade de linfócitos T em camundongos saudios e diabéticos  
Descrição: Avaliar parâmetros associados à biologia dos linfócitos T em camundongos saudios e diabéticos induzidos quimicamente por aloxana e estreptozotocina, afim de demonstrar possíveis alterações no comportamento da resposta imune dessas células influenciadas pela escolha do agente diabetogênico..  
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.  
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Luiz Adriano Damasceno de Queiroz - Coordenador / Joilson de Oliveira Martins - Integrante.

2017 - 2018

Alterações imunoistopatológicas hepáticas decorrentes da infecção humana por arbovírus: uma análise comparativa.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.  
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Luiz Adriano Damasceno de Queiroz - Integrante / Juarez Antônio Simões Quaresma - Coordenador.

2016 - 2016

Mapeamento dos cursos de graduação em Biomedicina do Brasil

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Luiz Adriano Damasceno de Queiroz - Integrante / Erica Silva de Souza Matsumura - Coordenador / Leonardo Henrique Almeida Hernández - Integrante.

## Idiomas

Português  
Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

## Produções

### Produção bibliográfica

### Resumos publicados em anais de congressos

1. SOUSA, E. S. A. ; **QUEIROZ, L. A. D.** ; MARTINS, J. O. . Role of hyperglycemia, inflammation and autophagy in bone marrow derived macrophages in Type 1 Diabetes. In: 51º Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, Maceió. 51º Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.
2. **QUEIROZ, L. A. D.**; GUIMARAES, J. P. T. ; ASSIS, J. B. ; SOUSA, E. S. A. ; MARTINS, J. O. ; SA-NUNES, A. . Comparative study of T lymphocyte activity in different murine models of experimental Type 1 diabetes mellitus. In: 51º Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, Maceió. 51º Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.
3. Ferreira, B. ; SILVA, C. L. V. ; HERNANDEZ, L. H. A. ; **QUEIROZ, L. A. D.** ; MENDONÇA, M. H. R. . ANÁLISES PARASITOLÓGICAS DE HORTALIÇAS COMERCIALIZADAS NO MERCADO DO VER-O-PESO, BELÉM-PA. In: 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical ? MedTrop 2018, 2018, Recife-PE. 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical ? MedTrop 2018, 2018.
4. FEITOSA JUNIOR, D. J. S. ; SILVA, L. M. ; **QUEIROZ, L. A. D.** ; HIRAI, K. E. ; AARAO, T. L. S. ; SOUSA, J. R. ; QUARESMA, J. A. S. . MODULAÇÃO E VERSATILIDADE DE RESPOSTA DA IL-33 NAS FORMAS POLARES DA HANSENÍASE. In: 53º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL / REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM CHAGAS E LEISHMANIOSES, 2017, Cuiabá/MT. 53º MEDTROP, 2017.
5. PRUDENTE, R. L. ; SILVA, L. M. ; **QUEIROZ, L. A. D.** ; HIRAI, K. E. ; AARAO, T. L. S. ; SOUSA, J. R. ; QUARESMA, J. A. S. . INVESTIGAÇÃO ESPECTRAL DE RESPOSTA DA IL-37 NA DOENÇA DE HANSEN. In: 53º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL / REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM CHAGAS E LEISHMANIOSES, 2017, Cuiabá/MT. 53º MEDTROP, 2017.
6. SANTOS JUNIOR, J. C. M. ; SILVA, L. M. ; **QUEIROZ, L. A. D.** ; HIRAI, K. E. ; AARAO, T. L. S. ; SOUSA, J. R. ; QUARESMA, J. A. S. . CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTA DA IL-17E NAS FORMAS POLARES DA HANSENÍASE. In: 53º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL / REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM CHAGAS E LEISHMANIOSES, 2017, Cuiabá/MT. 53º MEDTROP, 2017.
7. **QUEIROZ, L. A. D.**; MENDONÇA, M. H. R. ; NASCIMENTO, A. B. . FREQUÊNCIA DE PARASITAS EM ALFACE (LACTUCA SATIVA) COMERCIALIZADOS NA FEIRA LIVRE DO VER-O-PESO NA CIDADE DE BELÉM DO PARÁ.. In: XV Congresso Brasileiro de Biomedicina e III Congresso Internacional de Biomedicina, 2016, Bento Gonçalves/RS. XV Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2016.

### Apresentações de Trabalho

1. **QUEIROZ, L. A. D.**. Envelhecimento celular: Teoria genética. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

### Demais tipos de produção técnica

1. MATSUMURA, E. S. S. ; Júnior, A. S. S. ; Ribeiro, N. A. B. ; **QUEIROZ, L. A. D.** ; HERNANDEZ, L. H. A. ; Júnior, J. A. S. ; Santos, C. M. ; COSTA, R. J. F. ; ANDRIOLO, R. B. ; GONCALVES, N. V. . MAPEAMENTO DAS INSTITUIÇÕES DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DOS CURSOS DE BIOMEDICINA NO BRASIL. 2016. (Cartas, mapas ou similares/Outra).

## Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 3º Darwin Day da FMVZ - 2020. 2020. (Encontro).
2. 51º Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Comparative study of T lymphocyte activity in different murine models of experimental Type 1 diabetes mellitus. 2019. (Congresso).
3. Cancer and MicroRNA. 2019. (Outra).
4. MEETING CAPES PRINT: IMMUNOSENESCENCE AND CLINICAL CONSEQUENCES. 2019. (Simpósio).
5. XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia e XII Encontro de Virologia do Mercosul. 2017. (Congresso).
6. I DNA DAY UFPA. 2016. (Encontro).
7. I Simpósio de Neurociências e Comportamento - Diálogos Interdisciplinares. 2016. (Simpósio).
8. MPS DAY. 2016. (Encontro).
9. XV Congresso Brasileiro de Biomedicina e III Congresso Internacional de Biomedicina. FREQUÊNCIA DE PARASITAS EM ALFACE (LACTUCA SATIVA) COMERCIALIZADOS NA FEIRA LIVRE DO VER-O-PESO NA CIDADE DE BELÉM DO PARÁ. 2016. (Congresso).
10. XXVIII Congresso Brasileiro de Genética Médica e II Congresso Latinoamericano de Genética Médica. 2016. (Congresso).
11. 18º encontro nacional de biomedicina. 2015. (Encontro).
12. 18º encontro nacional de biomedicina. 2015. (Encontro).
13. II semana do cérebro de Marabá. 2015. (Exposição).
14. I Jornada Acadêmica da Liga de Genética Rosalind Franklind. 2015. (Outra).
15. I semana municipal de água de Marabá. 2015. (Simpósio).
16. Liga acadêmica de genética Rosalind Franklin. Envelhecimento celular: Teoria genética. 2015. (Encontro).
17. Liga acadêmica de Neurociências de Marabá. NeuroLiga-Marabá. 2015. (Encontro).
18. 18º encontro nacional de biomedicina. 2014. (Encontro).
19. Seminário sobre a saúde mental. 2014. (Seminário).
20. XVI Olimpíada Brasileira de Astronomia e Astronáutica. XVI Olimpíada Brasileira de Astronomia e Astronáutica. 2013. (Olimpíada).
21. II Workshop do curso de ciências naturais. 2011. (Feira).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **QUEIROZ, L. A. D.**. I Escola de Inverno em Análises Clínicas e Toxicológicas. 2019. (Outro).
2. **QUEIROZ, L. A. D.**. I congresso Amazônico de Pesquisa Experimental, I Simpósio de Genética e I Encontro de Biomedicina da Universidade do Estado do Pará. 2016. (Congresso).
3. **QUEIROZ, L. A. D.**. FEIRA VOCACIONAL DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ. 2015. .
4. **QUEIROZ, L. A. D.**. I Jornada Acadêmica da Liga de Genética Rosalind Franklin. 2015. (Outro).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 03/04/2020 às 12:36:58

Imprimir currículo

## ANEXO III



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 052.2018-P388

São Paulo, 14 de agosto de 2018.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 03 de agosto de 2018, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa "**Estudo comparativo da atividade de linfócitos T em camundongos sadios e diabéticos**" (Protocolo CEUA nº 388), conforme constante nos documentos apresentados:

- a. *Inclusão do estudante Luiz Adriano Damasceno de Queiroz como pesquisador principal.*
- b. *Alteração da vigência para 31/01/2021.*

Cordialmente,

**Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato**  
Coordenadora Decana da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a): Luiz Adriano Damasceno Queiroz  
FBC/FCF/USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 044.2020

São Paulo, 07 de agosto de 2020.

Prezada Senhora,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em **07 de agosto de 2020**, aprovou as alterações propostas para o projeto de pesquisa “Estudo comparativo da atividade de linfócitos T em camundongos saudáveis e diabéticos” (Protocolo CEUA nº 388), conforme constante nos documentos apresentados (carta solicitação alteração de título).

a) alteração do título do projeto, atualmente intitulado “Estudo comparativo da atividade de linfócitos T em camundongos saudáveis e diabéticos”, para “**Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T em camundongos diabéticos induzidos por aloxana e estreptozotocina**”;

b) inclusão da avaliação da evolução do DM1 nos animais no período de 10, 30, 60, 90 e 180 dias com acompanhamento do ganho/perda de peso, ingestão de água e ração, tolerância à insulina e à glicose, e desenvolvimento de aspectos clínicos gerais característicos da doença.

Cordialmente,

**Profa. Dra. Neuz Mariko Aymoto Hassimotto**  
Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Ilmo. Sr.  
Pesquisador: Luiz Adriano Damasceno de Queiroz  
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins  
FBC/FCF/USP

**APÊNDICES**

---

## Apêndice I

Tabelas A1. Valores individuais, média, desvio padrão (DP), e erro padrão da média (EPM) referentes às Figuras 9, na Caracterização do modelo de DM1 de acordo com a variação de glicemia e peso, da seção Resultados.

glicemia dia 0				glicemia dia 15			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	200	171	211	A1	109	396	339
A2	197	170	238	A2	134	503	410
A3	210	208	174	A3	124	483	308
A4	210	137	201	A4	131	580	297
A5	241	151	151	A5	115	151	385
A6		155	211	A6		336	388
Media	212	165	198	Media	123	408	355
DP	17	24	31	DP	11	152	47
EPM	8	10	13	EPM	5	62	19

Peso (g)									
	Dia 0			Dia 1			Dia 2		
	CT	ALX	STZ	CT	ALX	STZ	CT	ALX	STZ
A1	26,5	24,4	25,3	29,1	27,26	24,35	29,38	27,42	24,7
A2	27,15	24,83	25	29,8	24,3	24,1	30,02	24,38	24,62
A3	24,9	22,92	25	25,12	26,23	23,45	26,24	26,69	23,68
A4		23,83	24,5		28	22,55		27,8	23,05
A5		22,72			24,15			23,32	
Media	26,18	23,74	24,95	28,01	25,99	23,61	28,55	25,92	24,01
DP	1,16	0,91	0,33	2,52	1,73	0,80	2,02	1,97	0,79
EPM	0,67	0,41	0,17	1,46	0,77	0,40	1,17	0,98	0,40
	Dia 3			Dia 4			Dia 5		
	CT	ALX	STZ	CT	ALX	STZ	CT	ALX	STZ
A1	29,29	28,14	24,4	29,65	27,76	23,96	29,6	27,78	23,8
A2	30,67	24,37	24,52	30,76	23,63	23,96	31,99	23,7	24,27
A3	26,25	26,3	23,95	26,2	26,01	23,52	26,33	26,04	23,43
A4		27,5	22,79		27,42	22,54		26,62	22,48
A5		23,02			22,46			23,11	
Media	28,74	25,87	23,92	28,87	25,46	23,50	29,31	25,45	23,50
DP	2,26	2,14	0,79	2,38	2,33	0,67	2,84	1,98	0,76
EPM	1,31	0,96	0,39	1,37	1,17	0,33	1,64	0,89	0,38

## Apêndice II

Tabelas A2. Valores individuais, média, desvio padrão (DP), e erro padrão da média (EPM) referentes às Figuras 10,11, 12 e 13, e tabelas 3 e 4, das análises hematimétricas, da seção Resultados.

Eritrócitos ( $\times 10^6/\text{mL}$ )				Hemoglobina (g/dL)				Hematócrito (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	8,29	8,62	8,75	A1	12,8	12,6	13,9	A1	38	40,3	41,3
A2	8,7	8,61	11,02	A2	13,6	12,9	17	A2	40,4	40,7	52
A3	8,78	7,27	8,7	A3	13,7	10,6	13,9	A3	40,6	33,7	41,4
A4	7,78	8,31	8,1	A4	11,8	13,9	12,6	A4	35,3	41,3	38,3
A5	8,85	8,14	4,76	A5	13,4	13,1	7,6	A5	40,7	38,8	22,1
A6	9,11	8,7	11,17	A6	14	14,3	17,3	A6	42	42,2	54
A7	6,58	9,12	8,85	A7	9,7	14,5	13,6	A7	29,5	42,6	41,7
A8	4,68	4,83	4,24	A8	5,7	7,4	5,9	A8	20,7	21,9	18,8
A9	4,7	3,65	3,85	A9	6,4	5,7	5,6	A9	20,8	16,5	17,4
A10		4,87	3,02	A10		7,5	4,7	A10		22	13,4
A11		3,09	4,12	A11		4,9	6,4	A11		13,8	18,7
Media	7,50	6,84	6,96	Media	11,23	10,67	10,77	Media	34,22	32,16	32,65
DP	1,76	2,26	3,01	DP	3,22	3,63	4,78	DP	8,53	11,27	14,82
EPM	0,59	0,68	0,91	EPM	1,07	1,09	1,44	EPM	2,84	3,40	4,47

Volume corpuscular medio (fL)				Hemoglobina corpuscular media (pg)				Concentração de hemogl. cor. media (g/dL)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	45,9	46,8	47,2	A1	15,4	14,6	15,8	A1	33,6	31,2	33,6
A2	46,5	47,3	47,2	A2	15,6	14,9	15,4	A2	33,6	31,6	32,6
A3	46,3	46,4	47,6	A3	15,6	14,5	15,9	A3	33,7	31,4	33,5
A4	45,4	49,7	47,4	A4	15,1	16,7	15,5	A4	33,4	33,6	32,8
A5	46,1	47,7	46,5	A5	15,1	16	15,9	A5	32,9	33,7	34,3
A6	46,2	48,6	48,4	A6	15,3	16,4	15,4	A6	33,3	33,8	32
A7	45	46,8	47,2	A7	14,7	15,8	15,3	A7	32,9	34	32,6
A8	44	45	44	A8	12,2	15,2	14	A8	27,5	33,6	31,5
A9	44	45	45	A9	13,7	15,5	14,7	A9	30,9	34,3	32,5
A10		45	44	A10		15,5	15,6	A10		34,2	35,1
A11		45	45	A11		15,9	15,7	A11		35,5	34,5
Media	45,49	46,66	46,32	Media	14,74	15,55	15,38	Media	32,42	33,35	33,18
DP	0,96	1,60	1,54	DP	1,12	0,71	0,57	DP	2,04	1,36	1,12
EPM	0,32	0,48	0,46	EPM	0,37	0,21	0,17	EPM	0,68	0,41	0,34

Largura de distribuição de eritrócitos (%)			
Animal	CT	ALX	STZ
A1	14,9	15,7	15,3
A2	14,6	15,3	15,6
A3	15,3	15,3	15,7
A4	15,3	15,7	16,7
A5	15,6	16,3	15
A6	15,6	16	16,3
A7		16	15,3
Media	15,22	15,76	15,70
DP	0,40	0,37	0,60
EPM	0,16	0,14	0,23

Leucócitos (x10 <sup>6</sup> /mL)				Linfócitos (x10 <sup>6</sup> /mL)				Linfócitos (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	5,6	1,3	4,7	A1	4,7	0,9	3,5	A1	84,2	64,7	73,6
A2	3,8	4,2	5,6	A2	3	2,8	3,6	A2	79,9	66,1	64,9
A3	6,4	3,8	6,9	A3	4,5	2,8	4,5	A3	69,2	73,4	63,9
A4	7	1,6	4	A4	5,9	0,8	2,7	A4	84,7	49,8	67,6
A5	9,7	1,7	3,4	A5	7	1,2	2,3	A5	72,3	66,7	67,6
A6	10,4	2,7	5,2	A6	8,8	2	3,7	A6	84,6	74,3	70,7
A7	2	3	4,2	A7		2,1	3,2	A7		70	75,8
A8	4,8	0,5	1,2	Media	5,65	1,80	3,36	Media	79,2	66,4	69,2
A9	4,7	0,4	0,8	DP	2,05	0,85	0,72	DP	6,8	8,2	4,4
A10		0,8	0,9	EPM	0,84	0,32	0,27	EPM	2,8	3,1	1,7
A11		0,7	0,9								
Media				Monócitos (x10 <sup>6</sup> /mL)				Monócitos (%)			
Media	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
Media	6,04	1,88	3,44	A1	0,1	0	0,1	A1	2,4	2,4	3,1
DP	2,70	1,35	2,17	A2	0,1	0,1	0,2	A2	2	2,5	3,1
EPM	0,90	0,41	0,65	A3	0,2	0,1	0,2	A3	3,8	2,7	3,5
				A4	0,1	0	0,1	A4	1,7	2,5	2,5
				A5	0,3	0	0,1	A5	3,1	1,4	2,3
				A6	0,2	0,1	0,1	A6	1,9	2,2	2,6
				A7		0,1	0,1	A7		2,1	2,3
				Media	0,17	0,06	0,13	Media	2,48	2,26	2,77
				DP	0,08	0,05	0,05	DP	0,81	0,43	0,46
				EPM	0,03	0,02	0,02	EPM	0,33	0,16	0,18
Granulócitos (x10 <sup>6</sup> /mL)				Granulócitos (%)							
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ				
A1	0,8	0,4	1,1	A1	13,4	32,9	23,3				
A2	0,7	1,3	1,8	A2	18,1	31,4	32				
A3	1,7	0,9	2,2	A3	27	23,9	32,6				
A4	1	0,8	1,2	A4	13,6	47,7	29,9				
A5	2,4	0,5	1	A5	24,6	31,9	30,1				
A6	1,4	0,6	1,4	A6	13,5	23,5	26,7				
A7		0,8	0,9	A7		27,9	21,9				
Media	1,33	0,76	1,37	Media	18,37	31,31	28,07				
DP	0,64	0,30	0,47	DP	6,08	8,16	4,21				
EPM	0,26	0,11	0,18	EPM	2,48	3,08	1,59				

Plaquetas (x10 <sup>6</sup> /mL)				Plaquetócrito (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	958	937	1567	A1	0,479	0,431	0,689
A2	1315	380	1139	A2	0,578	0,19	0,512
A3	864	741	1460	A3	0,397	0,348	0,7
A4	1028	1216	1310	A4	0,442	0,547	0,602
A5	471	420	731	A5	0,24	0,205	0,328
A6	1302	1326	825	A6	0,611	0,583	0,404
A7	746	920	1309	A7		0,423	0,589
A8	645	562	162	Media	0,46	0,39	0,55
A9	94	345	410	DP	0,13	0,15	0,14
A10		485	212	EPM	0,05	0,06	0,05
A11		275	554				
Media	824,8	691,5	879,9	Volume plaquetário medio (fL)			
DP	391,5	362,8	505,8	Animal	CT	ALX	STZ
EPM	130,5	109,4	152,5	A1	5	4,6	4,4
				A2	4,4	5	4,5
Amplitude de distribuição plaquetária				A3	4,6	4,7	4,8
Animal	CT	ALX	STZ	A4	4,3	4,5	4,6
A1	16,3	16,1	15,9	A5	5,1	4,9	4,5
A2	15,9	16,5	15,9	A6	4,7	4,4	4,9
A3	15,9	16,1	16,2	A7		4,6	4,5
A4	15,8	16	16	Media	4,68	4,67	4,66
A5	16,9	16,8	16,1	DP	0,32	0,21	0,18
A6	16,4	16,1	16,2	EPM	0,13	0,08	0,07
A7		16,2	16				
Media	16,20	16,26	16,04				
DP	0,42	0,29	0,13				
EPM	0,17	0,11	0,05				

contagem manual total e diferencial medula ossea (N <sup>o</sup> células)																
Animal	blasto			N. imaturo			N. maduro			Linfócito			Monócito			
	CT	ALX	STZ	CT	ALX	STZ	CT	ALX	STZ	CT	ALX	STZ	CT	ALX	STZ	
A1		0	0	0	3	1	1	58	69	71	36	28	28	3	2	0
A2		0	0	0	3	3	4	68	66	81	28	27	13	1	4	2
A3		0	0	0	3	3	3	67	88	84	30	7	11	0	2	2
A4		1	0	0	2		0	69		83	26		17	2		0
A5		0	0	0	6	2	1	70	83	85	19	14	13	5	1	1
A6		0	0	0	3	7	0	70	72	82	26	20	17	1	1	1
Media		0,2	0	0	3,333	3,2	1,5	67	75,6	81	27,5	19,2	16,5	2	2	1
DP		0,4082	0	0	1,366	2,28	1,643	4,561	9,45	5,099	5,577	8,871	6,124	1,789	1,225	0,8944
EPM		0,2	0	0	0,5578	1,02	0,7	1,9	4,226	2,1	2,3	4	2,5	0,7303	0,5477	0,4

## Apêndice III

Tabelas A3. Valores individuais, média, desvio padrão (DP), e erro padrão da média (EPM) referentes às Figuras 14 e 15, das análises de expressão de citocinas no homogenato de baço e pâncreas, da seção Resultados.

IL-1B homogenato baço (pg/mL)				IL-2 homogenato baço (pg/mL)				IL-12p70 homogenato baço (pg/mL)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	33,27887	16,32815	7,824233	A1	1,013554	0,569958	0,091438	A1	0	0	0
A2	33,06638	9,300148	35,25453	A2	0,740527	0,539813	0,514891	A2	0	0	0
A3	15,3675	7,501069	41,64149	A3	0,40603	0	0,686957	A3	0	0	0
A4	31,50383	20,76693	42,98215	A4	1,12535	0,327103	0,616331	A4	0	0	0
A5	33,34915	21,63015	26,41977	A5	0,600744	0,650268	1,609395	A5	0	0	0
A6	118,65450	14,88785	26,28464	A6	0,350688	0,750277	0,782429	A6	0	0	0
A7		16,72625	57,08015	A7		0,301961	0,757844	A7		0	0
Media	29,31	15,31	33,93	Media	0,71	0,45	0,72	Media	0	0	0
DP	7,83	5,32	15,68	DP	0,32	0,26	0,46	DP	0	0	0
EPM	3,20	2,01	5,93	EPM	0,13	0,10	0,17	EPM	0	0	0

IL-17 homogenato baço (pg/mL)				IL-4 homogenato baço (pg/mL)				IL-6 homogenato baço (pg/mL)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	7,937286	23,21776	8,170113	A1	12,89759	8,233763	11,99095	A1	31,55136	18,08322	21,821
A2	12,67126	17,02616	24,55385	A2	8,130377	10,37581	5,721239	A2	28,14419	13,58455	11,53811
A3	11,71863	8,157625	23,15292	A3	7,884743	5,43469	6,8441	A3	25,04587	18,61932	7,232422
A4	14,35607	26,81528	22,16049	A4	8,34442	9,527501	5,676624	A4	29,20807	35,63711	13,69264
A5	23,06588	20,336	15,76498	A5	8,067973	8,103205	6,393105	A5	11,98336	27,51641	12,69901
A6	25,87188	18,00414	25,14877	A6	6,723881	8,740182	10,08566	A6	21,01956	21,79455	14,08313
A7		19,33012	19,06953	A7		9,031207	7,458241	A7		27,45793	19,73826
Media	15,94	18,98	19,72	Media	8,67	8,49	7,74	Media	24,49	23,24	14,40
DP	6,99	5,82	6,06	DP	2,15	1,56	2,40	DP	7,13	7,45	4,94
EPM	2,85	2,20	2,29	EPM	0,88	0,59	0,91	EPM	2,91	2,82	1,87

TNF-a homogenato baço (pg/mL)				INF-y homogenato baço (pg/mL)				IL-10 homogenato baço (pg/mL)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	0,100717	0	0	A1	43,99427	4,063243	9,14685	A1	15,1847	15,51678	12,04927
A2	0	0	0	A2	3,18089	34,84687	0	A2	12,74127	16,18629	14,88795
A3	0	0	0	A3	16,81483	0	0	A3	7,624619	9,791084	14,70199
A4	0	0	0	A4	13,21825	4,882991	1,886688	A4	12,55208	20,54642	12,91861
A5	0	0	0	A5	8,681801	4,570236	3,988709	A5	13,30204	15,24817	18,20933
A6	0	0	0	A6	0,777167	3,818921	6,594333	A6	13,86095	11,27279	17,20248
A7		0	0	A7		2,840019	9,517807	A7		15,73057	13,90237
Media	0,02	0,00	0,00	Media	14,44	7,86	4,45	Media	12,54	14,90	14,84
DP	0,04	0,00	0,00	DP	15,67	12,01	4,06	DP	2,59	3,51	2,21
EPM	0,02	0,00	0,00	EPM	6,40	4,54	1,53	EPM	1,06	1,33	0,84

IL-1B homogenato pâncreas (pg/mL)				IL-2 homogenato pâncreas (pg/mL)				IL-12p70 homogenato pâncreas (pg/mL)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	11,32757	5,847189	2,523516	A1	1,973723	0,658118	1,132654	A1	7,098198	0	2,92695
A2	14,13549	7,078574	2,393037	A2	3,766315	0,772544	1,045613	A2	8,437912	5,72819	2,558295
A3	6,963379	3,980691	3,186688	A3	1,840918	0,470579	1,103488	A3	2,427664	3,848199	1,728775
A4	6,895298	4,46841	3,155061	A4	1,601463	0,797143	1,114697	A4	5,51756	2,782204	2,443894
A5	5,574427	5,875252	3,152297	A5	1,019728	1,654759	0,909219	A5	1,696009	4,16947	2,756518
A6	4,581474	8,464499	6,783647	A6	1,452293	1,89358	1,547802	A6	3,431794	13,68797	0
A7		5,627888	6,908151	A7		0,752356	2,915171	A7		1,651292	7,943404
Media	8,25	5,91	4,01	Media	1,94	1,00	1,40	Media	4,77	4,55	2,91
DP	3,69	1,52	1,96	DP	0,95	0,54	0,70	DP	2,69	4,43	2,43
EPM	1,51	0,57	0,74	EPM	0,39	0,21	0,26	EPM	1,10	1,67	0,92

IL-17 homogenato pâncreas (pg/mL)				IL-4 homogenato pâncreas (pg/mL)				IL-6 homogenato pâncreas (pg/mL)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	22,76373	22,97783	17,54738	A1	16,08137	8,538975	7,454947	A1	51,68561	85,84264	37,33923
A2	37,10851	28,43723	18,57741	A2	23,07321	9,029069	7,135133	A2	87,27036	38,84893	34,08569
A3	28,44901	24,3191	19,72972	A3	12,6636	11,25381	5,827711	A3	56,24964	40,06562	25,66143
A4	10,70016	22,04327	25,56856	A4	11,25714	6,864986	8,566601	A4	50,13999	46,70924	24,53749
A5	26,01399	20,16901	22,48061	A5	9,038561	10,14142	10,80139	A5	50,58873	48,49078	35,17546
A6	17,59414	16,01969	0	A6	6,690447	8,87117	4,349033	A6	38,17292	88,36609	103,2399
A7		18,47956	21,57162	A7		8,327508	13,87302	A7		23,35251	58,99642
Media	23,77	21,78	17,93	Media	13,13	9,00	8,29	Media	55,68	53,10	45,58
DP	9,11	4,06	8,34	DP	5,82	1,39	3,19	DP	16,60	24,62	27,85
EPM	3,72	1,53	3,15	EPM	2,38	0,53	1,21	EPM	6,78	9,30	10,52

TNF-a homogenato pâncreas (pg/mL)				INF-y homogenato pâncreas (pg/mL)				IL-10 homogenato pâncreas (pg/mL)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	1,879677	0	0	A1	71,05963	29,80635	12,29441	A1	22,18824	21,33411	13,87206
A2	3,487383	1,779973	0,293854	A2	48,08104	83,30293	15,23261	A2	26,92741	14,85977	13,05911
A3	1,001833	1,553819	0	A3	55,3853	48,50513	10,11408	A3	21,48939	15,15413	16,17565
A4	0,904023	0,858252	0	A4	38,61676	25,35722	10,76226	A4	11,40287	18,73947	21,09893
A5	0,547648	1,277278	0,434285	A5	21,31314	42,47935	26,10493	A5	18,9374	16,34169	11,95496
A6	0,546345	2,127916	0	A6	15,07362	36,46411	0	A6	13,86681	17,89008	19,83908
A7		0,086398	1,288085	A7		30,45661	47,30688	A7		17,61368	14,55753
Media	1,39	1,10	0,29	Media	41,59	42,34	17,40	Media	19,14	17,42	15,79
DP	1,14	0,82	0,47	DP	21,09	19,74	15,28	DP	5,71	2,24	3,47
EPM	0,46	0,31	0,18	EPM	8,61	7,46	5,78	EPM	2,33	0,85	1,31

## Apêndice IV

Tabelas A4. Valores individuais, média, desvio padrão (DP), e erro padrão da média (EPM) referente à Figura 16, das análises proliferativa de linfócito *in vitro*, da seção Resultados.

CD4/Meio (MFI)				CD4/ ConA 0,5 (MFI)				CD4/ ConA 1 (MFI)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	21614	4099	25458	A1	2860	3279	4263	A1	2107	4066	2681
A2	22987	16730	21717	A2	3476	2975	3816	A2	2328	2766	2686
A3	6349	4831	15135	A3	3273	5302	3359	A3	2433	2686	2998
A4	16230	39383	20184	A4	2644	5313	3189	A4	2305	3626	2021
A5	25038	37710	32253	A5	2928	6390	6631	A5	2495	3339	2951
A6	33759	32486	20089	A6	6474	4721	2922	A6	2957	3113	2025
A7	33196	35251		A7	5147	6573		A7	2987	3469	
A8	28751	32176		A8	5370	5616		A8	3077	3145	
A9	40054	42239		A9	16730	12611		A9	3671	4986	
A10	10248	10554		A10	1906	2160		A10	1473	1278	
A11	12786	13023		A11	2629	1788		A11	1627	1503	
A12	16079	6836		A12	4556	1529		A12	2328	1258	
Media	22257,58	24407,45	22472,67	Media	4832,75	4854,75	4030,00	Media	2482,33	2936,25	2560,33
DP	10361,71	14623,69	5829,23	DP	3985,30	3018,43	1360,18	DP	619,34	1135,64	436,35
EPM	3453,90	6539,91	2379,77	EPM	1150,46	871,34	555,29	EPM	178,79	327,83	178,14

CD8/Meio (MFI)				CD8/ ConA 0,5 (MFI)				CD8/ ConA 1 (MFI)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	21411	1667	26700	A1	1225	1373	2052	A1	1078	1661	1283
A2	23538	19901	21923	A2	1484	1464	1987	A2	1283	1481	1397
A3	2275	3145	15746	A3	1405	4566	1448	A3	1280	1379	1532
A4	16808	9795	21160	A4	1330	4211	1280	A4	1386	1588	1080
A5	25157	12496	31640	A5	1353	4416	4380	A5	1302	1705	1327
A6	9974	6545	20862	A6	3107	3214	1242	A6	1042	1744	1076
A7	12757	44012		A7	3455	4643		A7	1512	1849	
A8	15455	38167		A8	3010	3332		A8	1459	1728	
A9	35850	34249		A9	14316	7546		A9	1136	2279	
A10	36812	35251		A10	1188	2021		A10	812	583	
A11	29659	30891		A11	1683	1256		A11	793	752	
A12	43483	44440		A12	6418	939		A12	970	737	
Media	22764,92	23379,92	23005,17	Media	3331,17	3248,42	2064,83	Media	1171,08	1457,17	1282,50
DP	12157,98	16188,59	5478,62	DP	3779,72	1953,07	1186,57	DP	238,50	512,69	179,44
EPM	3509,71	6608,96	2236,64	EPM	1091,11	563,80	484,41	EPM	68,85	148,00	73,26

## Apêndice V

Tabelas A5. Valores individuais, média, desvio padrão (DP), e erro padrão da média (EPM) referentes às Figuras 17 e 20, das análises histológicas do timo e pâncreas, da seção Resultados.

## Timo

Atrofia da região medular (intensidade)				Aumento Corpúsculo de Hassall (intensidade)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	0	1	1	A1	0	2	1
A2	0	1	1	A2	0	1	1
A3	0	1	1	A3	1	1	1
A4	0		1	A4	0		0
A5	0		1	A5	0		1
Media		0	1	Media		0,2	1,333
DP		0	0	DP		0,45	0,58
EPM		0	0	EPM		0,2	0,33

Diminuição células retículo-epiteliais (intensidade)				Morte celular de linfocitos/timocitos (intensidade)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	0	2	0	A1	2	1	2
A2	0	2	1	A2	2	1	2
A3	1	2	0	A3	2	0	2
A4	0		1	A4	2		2
A5	0		1	A5	3		2
Media		0,2	2	Media		2,2	0,6667
DP		0,45	0,00	DP		0,45	0,58
EPM		0,2	0	EPM		0,2	0,33

## Pâncreas

Atrofia da ilhota de Langerhans (intensidade)				Infiltração inflamatória (intensidade)				Hiperemia com dilatação vascular (intensidade)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	0	2	3	A1	0	1	0	A1	0	1	0
A2	0	2	3	A2	0	1	1	A2	0	1	1
A3	0	2	3	A3	0	1	1	A3	0	1	1
A4	0	2	2	A4	0	1	1	A4	0	0	1
A5	0	2	2	A5	0	1	1	A5	0	1	1
Media		0	2	Media		0	1	Media		0	0,8
DP		0	0	DP		0	0	DP		0	0,45
EPM		0	0	EPM		0	0	EPM		0	0,2

## Apêndice VI

Tabelas A6. Valores individuais, média, desvio padrão (DP), e erro padrão da média (EPM) referentes às Figuras 22, 23 e 24, das análises de imunofenotipagem dos linfócitos em timo, baço e pâncreas, da seção Resultados.

## Timo

CD3 (%)				CD4+CD8- (%)				CD4-CD8+ (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	66,2	60,8	56,4	A1	5,89	6,08	4,73	A1	1,94	2,21	1,47
A2	74	60,8	52,2	A2	6,56	7,26	6,81	A2	2,22	2,29	1,59
A3	68,6	62,3	53,7	A3	6,39	14,2*	6,9	A3	1,89	4,31*	1,89
A4	58,2	90,5	57,6	A4	5,61	6,84	5,13	A4	1,36	2,17	1,14
A5	63,1	97	52,5	A5	8,18	7,42	5,46	A5	1,92	2,64	1,26
A6	92,4	95,4	56,7	A6	7,46	9,74	4,84	A6	2,14	3,05	1,29
A7	97,7	8,42*		A7	8,3	8,3		A7	2,44	4,08	
A8	95,3	6,08*		A8	7,67	5,32		A8	2,4	2,46	
A9	6,36*	7,18*		A9	5,81	8,04		A9	2,98	3,82	
A10	6,40*	5,25*		A10	5,39	5,85		A10	2,5	2,97	
A11	6,48*	5,80*		A11	5,79	6,23		A11	2,61	2,52	
A12	7,69*	10,80*		A12	6,09	13,7*		A12	2,53	6,99*	
Media	76,94	77,80	54,85	Media	6,60	7,11	5,65	Media	2,24	2,82	1,44
DP	15,78	18,21	2,33	DP	1,04	1,33	0,97	DP	0,43	0,67	0,27
EPM	5,58	7,43	0,95	EPM	0,30	0,42	0,40	EPM	0,12	0,21	0,11

CD4+CD8+ (%)				CD25 (%)				CD19 (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	55,2	47,9	46,2	A1	1,15	2,5	1,64	A1	0,28	1,33	0,38
A2	62,6	46,7	39,5	A2	0,83	1,86	1,78	A2	0,26	0,63	0,55
A3	57,1	37,2	40,8	A3	1,06	1,77	1,67	A3	0,26	1,04	0,84
A4	48,7	80,6	48,1	A4	0,9	1,56	1,06	A4	0,29	7,91*	0,2
A5	50,3	82,9	40,4	A5	2,26	1,89	2,06	A5	0,27	2,65*	0,61
A6	81,8	77	47,2	A6	1,37	2,27	1,06	A6	0,42*	2,16*	0,32
A7	83,4	66,4		A7	1,46	0,37*		A7	0,75*	1,2*	
A8	82,5	84,2		A8	1,59	0,18*		A8	0,4*	0,81*	
A9	85,8	77,5		A9	0,120*	0,15*		A9	0,3*	9,77*	
A10	86,4	77,6		A10	0,180*	0,28*		Media	0,27	1,00	0,48
A11	86,2	81,8		A11	0,097*	0,20*		DP	0,01	0,35	0,23
A12	86,1	40,2		A12	0,430*	0,22*		EPM	0,01	0,20	0,09
Media	72,18	66,67	43,70	Media	1,33	1,98	1,55				
DP	15,78	18,23	3,87	DP	0,46	0,35	0,40				
EPM	4,56	5,26	1,58	EPM	0,16	0,14	0,16				

## Baço

CD3 (%)				CD4 (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	27,2	28	29,7	A1	15,4	16	17,7
A2	30,3	34,3	29,5	A2	16,8	18,7	17,9
A3	27,8	27,8	32,1	A3	15,9	15,6	18,8
A4	29,9	23,6	26	A4	16,6	14,3	15,5
A5	34,2	27,3	30,8	A5	20,7	16,5	17,3
A6	27,6	28,3	29,4	A6	16,5	17,9	17,1
A7	28,9	28,6		A7	18	16,7	
A8	30,7	25,8		A8	19,7	15,8	
A9	28,3	31,6		A9	17,1	19,2	
A10	26,7	32,5		A10	15,7	19,6	
A11	30,5	29,7		A11	18,2	18,3	
A12	27,2	32,3		A12	16,4	18,9	
Media	29,11	29,15	29,58	Media	17,25	17,29	17,38
DP	2,14	3,07	2,04	DP	1,62	1,70	1,10
EPM	0,62	0,89	0,83	EPM	0,47	0,49	0,45

CD8 (%)				CD19 (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	10,6	10,2	10,5	A1	60,8	55,5	57,3
A2	11,7	13,8	10,4	A2	57,9	52,8	60,7
A3	10,6	10,6	11,9	A3	60,1	58,6	55,8
A4	11,7	8,05	9,02	A4	60	57,3	59,5
A5	12	9,3	11,8	A5	55,8	63,9	51,1
A6	9,71	8,91	10,7	A6	63,2	56,2	55,3
A7	9,2	10,7		A7	63,6	57,5	
A8	9,43	8,46		A8	60,7	60,2	
A9	9,62	11		A9	63	58,7	
A10	9,46	11,2		Media	60,57	57,86	56,62
A11	10,8	10,1		DP	2,56	3,11	3,41
A12	9,04	12		EPM	0,85	1,04	1,39
Media	10,32	10,36	10,72				
DP	1,06	1,60	1,06				
EPM	0,31	0,46	0,43				

## Pâncreas

CD3 (%)				CD4 (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	4,55*	0,14	0,21	A1	2,15*	0,047	0
A2	4,7*	0,13	0,25	A2	2,2*	0	0
A3	1,53	0,89	0,095	A3	0,9	0,31	0,047
A4	1,53	0,61	0,43	A4	0,6	0,26	0,21
A5	0,32	0,24	2*	A5	0,091	0,15	0,67
A6	3,52*	0,19	0,26	A6	2,16*	0,097	0
A7	0,75	0,15		A7	0,4	0,07	
A8	0,23	0,32		A8	0,12	0,13	
A9	0,38	0,34		A9	0,21	0,2	
Media	0,79	0,33	0,25	Media	0,39	0,14	0,15
DP	0,60	0,26	0,12	DP	0,32	0,10	0,27
EPM	0,24	0,09	0,05	EPM	0,13	0,03	0,11

CD8 (%)				CD19 (%)			
Animal	CT	ALX	STZ	Animal	CT	ALX	STZ
A1	1,9*	0	0,052	A1	0,85	0,23	0,52
A2	2,05*	0	0,21	A2	5,15*	0,089	0,46
A3	0,43	0,540*	0,047	A3	1,14	1,12	0,095
A4	0,67	0,27	0,17	A4	1,07	0,78	0,6
A5	0,091	0,049	1,000*	A5	0,36	0,52	1,93*
A6	1,17*	0,041	0,1	A6	9,03*	0,39	0,1
A7	0,29	0,041		A7	1,57	0,19	
A8	0,058	0,12		A8	0,48	0,42	
A9	0,11	0,083		A9	0,66	0,48	
Media	0,27	0,08	0,12	Media	0,88	0,47	0,36
DP	0,24	0,09	0,07	DP	0,42	0,32	0,24
EPM	0,10	0,03	0,03	EPM	0,16	0,11	0,11

## Apêndice VII

Tabelas A7. Valores individuais, média, desvio padrão (DP), e erro padrão da média (EPM) referentes às Figuras 25,26 e 27, das análises da resposta imunológica adaptativa *in vivo* e *in vitro*, da seção Resultados.

0 horas (mm)								
Animal	CTN		CT		ALX		STZ	
	Pata esq(pbs)	Pata dir(OVA)						
A1	1,59	1,62	1,57	1,59	1,48	1,42	1,55	1,57
A2	1,55	1,56	1,58	1,58	1,48	1,57	1,57	1,53
A3	1,65	1,63	1,53	1,56	1,52	1,46	1,58	1,54
A4			1,57	1,55	1,51	1,48	1,54	1,57
A5			1,58	1,57	1,54	1,55	1,55	1,55
A6					1,52	1,55	1,56	1,5
Media	1,60	1,60	1,57	1,57	1,51	1,51	1,56	1,54
DP	0,05	0,04	0,02	0,02	0,02	0,06	0,01	0,03
EPM	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01

6 horas (mm)								
Animal	CTN		CT		ALX		STZ	
	Pata esq(pbs)	Pata dir(OVA)						
A1	1,6	1,72	1,62	2,03	1,53	1,8	1,54	1,96
A2	1,58	1,68	1,57	1,95	1,53	1,79	1,57	1,91
A3	1,71	1,71	1,59	1,87	1,51	1,73	1,56	2,07
A4			1,61	1,87	1,53	1,71	1,58	2
A5			1,55	1,84	1,54	1,87	1,54	1,96
A6					1,61	1,83	1,57	1,88
Media	1,63	1,70	1,59	1,91	1,54	1,79	1,56	1,96
DP	0,07	0,02	0,03	0,08	0,03	0,06	0,02	0,07
EPM	0,04	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	0,03

24 horas (mm)								
Animal	CTN		CT		ALX		STZ	
	Pata esq(pbs)	Pata dir(OVA)						
A1	1,63	1,61	1,6	1,6	1,57	1,5	1,6	1,55
A2	1,58	1,58	1,56	1,54	1,55	1,59	1,62	1,62
A3	1,65	1,67	1,56	1,58	1,54	1,53	1,59	1,6
A4			1,6	1,6	1,51	1,5	1,56	1,66
A5			1,59	1,55	1,53	1,54	1,54	1,58
A6					1,57	1,54	1,51	1,52
Media	1,62	1,62	1,58	1,57	1,55	1,53	1,57	1,59
DP	0,04	0,05	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,05
EPM	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02

Meio (O.D)					ConA 0,5 (D.O)					ConA 1 (D.O)				
Animal	CTN	CT	ALX	STZ	Animal	CTN	CT	ALX	STZ	Animal	CTN	CT	ALX	STZ
A1	-0,005	0,0086	0,0108	-0,018	A1	0,367	0,7942	0,7778	-0,0178	A1	0,513	0,9465	0,9163	0,5056
A2	0,049	0,0556	0,0112	0,0239	A2	0,749	0,7988	0,7752	0,0239	A2	0,887	0,9654	0,9648	0,8378
A3	-0,023	0,0207	-0,0157	-0,018	A3	0,542	0,8853	0,7041	-0,0184	A3	0,566	0,938	0,8126	0,6829
A4		-0,0148	0,0207	0,0552	A4		0,6895	0,7952	0,0552	A4		0,8485	0,9039	0,7832
A5		-0,0013	0,0426	0,0361	A5		0,7227	0,7351	0,0361	A5		0,863	0,9427	0,8248
A6			0,0022	0,0504	A6			0,7672	0,0504	A6			0,9218	0,7847
Media	0,01	0,01	0,01	0,02	Media	0,55	0,78	0,76	0,02	Media	0,66	0,91	0,91	0,74
DP	0,04	0,03	0,02	0,03	DP	0,19	0,08	0,03	0,03	DP	0,20	0,05	0,05	0,13
EPM	0,02	0,01	0,01	0,01	EPM	0,11	0,03	0,01	0,01	EPM	0,12	0,02	0,02	0,05

OVA 1 (D.O)					OVA 10 (D.O)				
Animal	CTN	CT	ALX	STZ	Animals	CTN	CT	ALX	STZ
A1	0,015	0,0293	0,0318	-0,0477	A1	0,006	0,0578	0,0334	-0,0394
A2	0,039	0,0889	0,0424	0,0437	A2	0,081	0,0181	0,0906	0,0477
A3	-0,016	0,0581	-0,0146	-0,0232	A3	-0,017	0,0793	0,0159	0,0047
A4		-0,007	0,0362	0,1744	A4		0,0343	0,0311	0,1316
A5		-0,0089	0,0717	0,0229	A5		0,0529	0,0976	0,0447
A6			0,0464	0,0319	A6			0,0664	0,0335
Media	0,01	0,03	0,04	0,03	Media	0,02	0,05	0,06	0,04
DP	0,03	0,04	0,03	0,08	DP	0,05	0,02	0,03	0,06
EPM	0,02	0,02	0,01	0,03	EPM	0,03	0,01	0,01	0,02

IgG1 (D.O)					IgG2a (D.O)				
Animal	CTN	CT	ALX	STZ	Animal	CTN	CT	ALX	STZ
A1	0,144	1,275	1,389	1,216	A1	0,085	0,17	0,134	0,062
A2	0,011	1,355	1,424	1,259	A2	0,11	0,744*	0,088	0,074
A3	0,033	1,411	1,24	1,123	A3	0,06	0,074	0,047	0,061
A4		1,301	1,402	1,31	A4		0,106	0,08	0,134
A5		1,1335	1,192	1,386	A5		0,1	0,101	0,118
A6			1,574	1,476	A6			0,087	0,161
Media	0,06	1,30	1,37	1,30	Media	0,09	0,11	0,09	0,10
DP	0,07	0,10	0,14	0,13	DP	0,03	0,04	0,03	0,04
EPM	0,04	0,05	0,06	0,05	EPM	0,01	0,02	0,01	0,02