

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE

**Caracterização das populações de células T reguladoras e células T
produtoras de IL-17 durante o desenvolvimento do diabetes induzido por
estreptozotocina e avaliação do potencial terapêutico de células estromais
mesenquimais nesse modelo experimental**

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE

Caracterização das populações de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 durante o desenvolvimento do diabetes induzido por estreptozotocina e avaliação do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais nesse modelo experimental

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

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Voltarelli

Ribeirão Preto

2010

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Yaochite, Juliana Navarro Ueda

Caracterização das populações de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 durante o desenvolvimento do diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina e avaliação do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais nesse modelo experimental. Ribeirão Preto, 2010.

180 p. il., 30cm.

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Voltarelli, Júlio César

1. Diabetes mellitus tipo 1, 2. Estreptozotocina, 3. Células T reguladoras,
4. Células T produtoras de IL-17, 5. Células estromais mesenquimais

Folha de Aprovação

Juliana Navarro Ueda Yaochite

Caracterização das populações de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 durante o desenvolvimento do diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina e avaliação do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais nesse modelo experimental.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Julio e Tereza,

fonte de amor e inspiração...

Agradecimentos:

Agradeço do fundo do coração:

- *Ao Dr. Julio pela confiança, por permitir acompanhar de perto suas atividades e fazer com que minha admiração por seu profissionalismo e sua exemplar dedicação aos pacientes crescesse a cada dia;*
- *Ao Hemocentro de Ribeirão Preto e todos os funcionários (limpeza, copa, biblioteca...), por me acolher e ser meu segundo lar durante esses anos que passaram. À Lê tradutora por toda ajuda prestada;*
- *À Kelen, por todos os ensinamentos, pela paciência e tempo desprendido para me ajudar sempre que foi preciso, pela oportunidade em trabalhar nesse grupo de pesquisa tão almejado e pela confiança depositada em mim;*
- *À Dani Carlos, pelo carinho e ajuda, pela boa vontade e presteza, por ter facilitado de forma imensurável a realização deste trabalho, pela ajuda na correção da tese;*
- *Ao laboratório de Citometria de Fluxo, à Carmem pela presteza, à Camila pelo auxílio em diversos experimentos e em especial à Paty por compreender a importância de meu trabalho e principalmente por todos os milhares de tubos que passou e os milhares de resultados que analisou;*
- *Aos laboratórios de Biologia Molecular e Terapia Celular pela ajuda sempre que foi necessária;*
- *Ao laboratório de Citogenética, em especial à Rita e Viviane, pela ajuda na utilização do microscópio de fluorescência;*

- Ao laboratório de Transferência Gênica, em especial aos amigos Danilo, Lucas, Nath e Ricardo, por todos os bons momentos compartilhados, pelas risadas, pelas angústias e principalmente pelas discussões filosóficas. Lucas obrigada pelas MSCs de camundongos e por me ajudar no nosso amigo IVIS, Nath obrigada pelas infusões e Elisas, e Ricardo obrigada pela ajuda na formatação da tese;

- Aos companheiros de laboratório, Ana Elisa, Heloise, Amanda, Gislane, Alessandra, Júlia, Kamilla e Natanael pelo convívio e por toda ajuda prestada e em especial ao Mário pela ajuda e paciência na realização dos Elisas;

- Ao laboratório do Prof. Fernando Cunha, por permitir a utilização de diversos equipamentos e em especial à Giu, pelas inúmeras dosagens de citocinas;

- Ao laboratório do Prof. João Santana, por toda ajuda prestada e em especial ao Prof. João Santana pelo profissionalismo e dedicação ao departamento de Imunologia Básica e Aplicada. À Cris Barros, por toda ajuda sempre que foi necessária;

- À Ana, secretária do Departamento de Imunologia Básica e Aplicada por toda ajuda e presteza;

- Ao laboratório de Patologia, em especial à Prof. Leandra Zanardi, pelas milhares de amostras processadas, pelo bom acolhimento e pela boa vontade em ceder seus equipamentos para confecção das lâminas de histologia;

- Aos serviços de biotério Central e da FCFRP por toda ajuda prestada;

- Aos amigos da Imuno, em especial ao Rafa e Elyara, pela amizade, companheirismo, pelas angústias e alegrias passadas dentro e principalmente fora da sala de aula;

- À Gabi, pela parceria, pelas risadas e por todos os momentos bons compartilhados;

- À Carol Furinho pela amizade incondicional, por toda ajuda profissional e sentimental nesses dois anos de mestrado, por ser essa amiga tão cuidadosa e preocupada;

- À Má (Craudete) por ser meu anjinho da guarda, meu braço direito. Por me socorrer em um momento tão necessário, pelo companheirismo e amizade;

- Aos amigos da Unesp de Rio Claro, em especial à Lígia, pela amizade, preocupação e incentivo;

- Aos amigos de Santo André, em especial à Bia, Simone e Máira, pela amizade e apoio;

- À minha segunda família, D.Edna, Sr.Vanderlei, Nara, Jana, Wanderley e agregados, pelo carinho, pelo conforto e incentivo durante todos esses anos;

- Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela distância suportada, pela torcida, pela confiança, pelo conforto. Amo muito vocês!

- Aos meus irmãos, cunhadas, tios e tia pelo amor e carinho. À minha princesinha Liz, por me dar inspiração a cada dia;

- Ao amor da minha vida, que mesmo tão longe está tão perto em meu coração. Já, esta é uma conquista nossa. Obrigada por ser meu ouvinte, meu amante, meu melhor amigo, meu chão. Obrigada pelo incentivo e por acreditar em mim. Te amo!

- À Deus, por tonar tudo isso possível. Por ter colocado em meu caminho pessoas muito especiais, pela saúde e disposição em todos os dias desta caminhada. Por me fazer uma pessoa melhor, por me fazer acreditar que as pessoas e as dificuldades valem a pena!

A todos vocês meu sincero: MUITO OBRIGADA!!!!

Resumo

O diabetes mellitus do tipo 1 é uma doença autoimune órgão-específica, mediada por células T e é caracterizada pela destruição seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina. O tratamento convencional é feito com insulina e outras abordagens terapêuticas são limitadas, como o transplante de ilhotas pancreáticas. Esse cenário estimula novas pesquisas em busca de alternativas terapêuticas, tais como o tratamento com células-tronco. As células estromais mesenquimais (MSCs) possuem capacidade de diferenciar-se em outros tipos celulares, de migrar para tecido lesados, de modular o sistema imunológico e de secretar diversas citocinas e fatores de crescimento. O diabetes experimental pode ser induzido através de múltiplas doses de estreptozotocina (STZ) em camundongos de linhagens suscetíveis, no qual o efeito tóxico da droga promove a liberação de antígenos das células beta pancreáticas e estimula uma reação imune contra essas células. Muitos estudos têm mostrado a relação de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 (Th17 e Tc17) na patogênese de diversas doenças autoimunes, no entanto, a real função dessas células no diabetes não está totalmente esclarecida. Desta forma, o presente estudo teve dois objetivos principais: (I) avaliar a população de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 no modelo de diabetes induzido por STZ em camundongos C57BL/6 e (II) avaliar o potencial terapêutico de células estromais mesenquimais (MSCs) humanas nesse modelo experimental. Os períodos iniciais de desenvolvimento do diabetes foram marcados por uma diminuição na expressão de moléculas reguladoras CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T $CD4^+CD25^+$ no baço dos animais diabéticos e aumento na quantidade de células T $CD4^+CD25^+$ positivas para Foxp3 e células T produtoras de IL-17 nos linfonodos pancreáticos desses animais. Ainda nesta fase de progressão da doença, observamos níveis aumentados de IL-6, IFN- γ e TNF- α no pâncreas dos animais tratados com STZ e não observamos aumento na concentração de IL-17, sugerindo a participação de células Th1 na destruição das células beta pancreáticas. Nos períodos mais tardios de desenvolvimento da doença, observamos aumento na expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T $CD4^+CD25^+$, bem como aumento nos níveis de IL-10 no pâncreas dos animais diabéticos, sugerindo um estágio de regulação e finalização da resposta imune. Com relação ao potencial terapêutico das MSCs no tratamento do diabetes experimental, observamos que duas infusões de MSCs humanas em camundongos C57BL/6 diabéticos foram capazes de reverter a hiperglicemia dos animais diabéticos, e além disso, os animais tratados apresentaram aumento na massa de células beta produtoras de insulina, sugerindo um possível processo de regeneração promovido pelo transplante de MSCs. Desta forma, podemos sugerir que as células T produtoras de IL-17 participam nos períodos iniciais de desenvolvimento do diabetes neste modelo experimental, não atuando de forma direta na destruição das células beta, mas ficando retidas nos linfonodos pancreáticos. Além disso, os mecanismos reguladores da resposta imune começam a aparecer nos períodos mais tardios de progressão da doença. O tratamento com MSCs se mostrou eficaz podendo ser realizado de forma não restrita ao MHC.

Palavras-chave: 1. Diabetes mellitus tipo 1, 2. Estreptozotocina, 3. Células T reguladoras, 4. Células T produtoras de IL-17, 5. Células estromais mesenquimais

Abstract

Type 1 diabetes mellitus is an organ-specific autoimmune disease, mediated by T cells and characterized by the selective destruction of insulin producing pancreatic β cells. The conventional treatment is performed by the administration of insulin and therapeutic approaches such as pancreatic islet transplantation are limited. This scenery stimulates new researches in the pursuit of therapeutic alternatives, as the treatment with stem cells. Mesenchymal stromal cells (MSCs) have the capacity to differentiate in other cell types, as well as migrate to damaged tissues, modulate the immune system and secrete several cytokines and growth factors. The experimental diabetes can be induced through multiple doses of streptozotocin (STZ) in susceptible lineages of mice, in which the toxic effect of the drug promotes the release of pancreatic β cells antigens and stimulates an immune reaction against these cells. Several studies have demonstrated the relation between regulatory T cells and the IL-17-producing T cells (Th17 e Tc17) in the pathogenesis of autoimmune diseases, however, the real function of these cells in diabetes is not totally clarified. Thus, this study presented two main objectives: (I) evaluate the population of regulatory T cell and IL-17-producing T cell in STZ induced diabetes in C57BL6 mice and (II) evaluate the therapeutic potential of human mesenchymal stromal cells (MSCs) in experimental diabetes. The initial periods of development of diabetes were characterized by a decrease in the expression of the regulatory molecules CTLA-4, GITR and PD-1 in the surface of $CD4^+CD25^+$ T cells in the spleen of diabetic animals and an increase in the number of $CD4^+CD25^+$ T cells positive for Foxp3 and IL-17-producing T cells in the pancreatic lymph nodes of these animals. At this stage of the disease progression, we could observe increased levels of IL-6, IFN- γ and TNF- α in the pancreas of STZ treated animals, and we did not detected an increase in the IL-17 concentration, suggesting the participation of Th1 cells in the destruction of pancreatic β cells. In the late periods of the disease development, we could observe an increase in the expression of molecules CTLA-4, GITR and PD-1 in the surface of $CD4^+CD25^+$ T cells as well as an increase in the levels of IL-10 in the pancreas of diabetic animals, suggesting a phase of regulation of immune response. Concerning the therapeutic potential of MSCs in the treatment of experimental diabetes, we observed that two infusions of human MSCs in diabetic C57BL/6 mice could recover the hyperglycemia of diabetic animals, moreover, the treated animals presented an increase in the insulin producing β cells mass, suggesting a possible regeneration process promoted by the transplantation of MSCs. This way, we can suggest that IL-17 producing T cells participate in the initial periods of diabetes development in this experimental model, not acting in a direct way in the destruction of beta cells, but being placed in pancreatic lymph nodes. Besides the regulatory mechanisms of immune response arise in the late periods of the disease progression. The treatment with MSCs showed itself effective, and it can be performed in a non-restricted MHC way.

Keywords: 1. Type 1 diabetes mellitus, 2. Streptozotocin, 3. Regulatory T cells, 4. IL-17-producing T cells, 5. mesenchymal stromal cells

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Possíveis mecanismos de interação entre MSCs e as células do sistema imunológico. | 39 |
| Figura 2. Evolução da hiperglicemia dos camundongos tratados com múltiplas doses de STZ. | 58 |
| Figura 3. Evolução do massa corporal dos camundongos controles e tratados com múltiplas doses de STZ. | 60 |
| Figura 4. Análises histológicas do pâncreas de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 64 |
| Figura 5. Análise da massa de células beta produtoras de insulina nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 65 |
| Figura 6. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 66 |
| Figura 7. Análise das populações de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , macrófagos e células dendríticas presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após indução do diabetes. | 67 |
| Figura 8. Análise das populações de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 68 |
| Figura 9. Análise da expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 70 |
| Figura 10. Análise da população de células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 72 |
| Figura 12. Análise da população de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 75 |
| Figura 13. Análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-17 ⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 75 |
| Figura 14. Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. | 76 |
| Figura 15. Análise histológica do pâncreas de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 78 |
| Figura 16. Análise da massa de células beta produtoras de insulina nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 79 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 80 |
| Figura 18. Análise das populações de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , macrófagos e células dendríticas presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 81 |
| Figura 19. Análise das populações de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 82 |
| Figura 20. Análise da expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 84 |
| Figura 21. Análise da população de células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 86 |
| Figura 22. Análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-17 presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 86 |
| Figura 23. Análise da população de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 88 |
| Figura 24. Análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-17 ⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 88 |
| Figura 25. Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. | 89 |
| Figura 26. Análise histológica do pâncreas de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. | 91 |
| Figura 27. Análise da massa de células beta produtoras de insulina nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. | 92 |
| Figura 28. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. | 93 |
| Figura 29. Análise das populações de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , macrófagos e células dendríticas presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. | 94 |
| Figura 30. Análise das populações de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. . | 95 |

| | |
|---|-----|
| Figura 31. Análise da expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. | 97 |
| Figura 32. Análise da população de células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. | 99 |
| Figura 33. Análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-17 presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes..... | 99 |
| Figura 34. Análise da população de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes..... | 101 |
| Figura 35. Análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-17 ⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes..... | 101 |
| Figura 36. Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. | 102 |
| Figura 37. Análise histológica do pâncreas de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. | 104 |
| Figura 38. Análise da massa de células beta produtoras de insulina nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes..... | 105 |
| Figura 39. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. | 106 |
| Figura 40. Análise das populações de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , macrófagos e células dendríticas presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. | 107 |
| Figura 41. Análise das populações de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. .. | 108 |
| Figura 42. Análise da expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. | 110 |
| Figura 43. Análise da população de células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. | 112 |
| Figura 44. Análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-17 presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes..... | 112 |

| | |
|---|-----|
| Figura 45. Análise da população de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes..... | 114 |
| Figura 46. Análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-17 ⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes..... | 114 |
| Figura 47. Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes..... | 115 |
| Figura 48. Aspecto morfológico das MSCs humanas cultivadas em terceira passagem..... | 118 |
| Figura 49. Caracterização imunofenotípica da amostra MSC1 isolada de medula óssea de indivíduo saudável. | 120 |
| Figura 50. Caracterização imunofenotípica da amostra MSC2 isolada de medula óssea de indivíduo saudável. | 121 |
| Figura 51. Diferenciação adipogênica e osteocítica das células mesenquimais da amostra MCS1.... | 122 |
| Figura 52. Evolução das taxas glicêmicas dos animais que responderam ao tratamento com as MSCs (respondedores)..... | 125 |
| Figura 53. Evolução das taxas glicêmicas dos animais que não responderam ao tratamento com as MSCs (não respondedores). | 126 |
| Figura 54. Evolução da glicemia (mg/dl) dos animais diabéticos tratados ou não com MSCs. A glicemia dos animais foi monitorada periodicamente, pela manhã, na ausência de jejum.). | 127 |
| Figura 55. Teste de tolerância a glicose..... | 129 |
| Figura 56. Análises histológicas do pâncreas dos animais tratados ou não com MSCs..... | 130 |
| Figura 57. Avaliação da massa de células beta produtoras de insulina de camundongos WT e diabéticos..... | 133 |
| Figura 58. Avaliação da massa de células beta produtoras de insulina de camundongos respondedores e não respondedores à terapia com MSCs..... | 134 |
| Figura 59. Avaliação da massa de células alfa produtoras de glucagon de camundongos WT e diabéticos..... | 135 |
| Figura 60. Avaliação da massa de células alfa produtoras de glucagon respondedores e não respondedores à terapia com MSCs.. | 136 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Efeito biológico das MSCs em estudos pré-clínicos de diversas doenças..... | 41 |
| Tabela 2. Estudos utilizando MSCs como terapia para o diabetes experimental..... | 44 |
| Tabela 3. Valores das taxas glicêmicas (mg/dl) dos animais controles e dos animais tratados com múltiplas doses de STZ..... | 59 |
| Tabela 4. Valores da massa corporal (g) dos animais controles e dos animais tratados com múltiplas doses de STZ..... | 61 |
| Tabela 5. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes..... | 71 |
| Tabela 6. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes..... | 71 |
| Tabela 7. Concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático de camundongos controles e tratados com STZ, seis dias após indução do diabetes..... | 77 |
| Tabela 8. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após indução do diabetes..... | 85 |
| Tabela 9. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após indução do diabetes..... | 85 |
| Tabela 10. Concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático de camundongos controles e diabéticos onze dias após tratamento com STZ..... | 90 |
| Tabela 11. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes..... | 98 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 12. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes..... | 98 |
| Tabela 13. Concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático de camundongos controles e diabéticos dezoito dias após tratamento com STZ..... | 102 |
| Tabela 14. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após a indução do diabetes. | 111 |
| Tabela 15. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após a indução do diabetes. | 111 |
| Tabela 16. Concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático de camundongos controles e diabéticos vinte e cinco dias após tratamento com STZ..... | 116 |
| Tabela 17. Glicemia dos camundongos (mg/dl) tratados com STZ que receberam as infusões de MSCs (n=7) no período de 21 dias após tratamento com STZ (primeira infusão) e 28 dias após STZ (segunda infusão). | 123 |
| Tabela 18. Evolução da glicemia (mg/dl) dos animais que responderam ao tratamento com MSCs (respondedores, n=5)..... | 125 |
| Tabela 19. Evolução da glicemia (mg/dl) dos animais que não responderam ao tratamento com MSCs (não respondedores, n=2). | 126 |
| Tabela 20. Glicemia dos camundongos tratados com STZ 120 dias após a segunda infusão de MSCs ou PBS..... | 127 |
| Tabela 21. Evolução das taxas glicêmicas dos animais durante o teste de tolerância a glicose..... | 129 |
| Tabela 22. Quantificação da área positiva para insulina nas ilhotas pancreáticas. | 132 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AIC: artrite induzida por colágeno
- AIRE: *autoimmune regulator*
- APCs: células apresentadoras de antígeno
- BB rats: ratos *BioBreeding*
- BSA: albumina de soro bovino
- CFSE: *carboxyfluorescein succinimidyl ester*
- conA: concanavalina-A
- CTLA-4: *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*
- DAB: diaminobenzidina
- DAIs: doenças autoimunes
- DAPI: *4,6 diamidino-2- pheyilindole*
- DM-1: diabetes mellitus tipo 1
- DMSO: dimetilsulfóxido
- EAE: Encefalomielite autoimune experimental
- EAE: encefalomielite autominue experimental
- ELISA: *enzyme linkedi immuno sorbent assay*
- EM: esclerose múltipla
- FACs: Fluorescence-Activated Cell Sorting
- FITC: isotiocianato de fluoresceína
- FoxP3: forkhead box 3
- FSC: forward scatter
- GAD: decarboxilase do ácido glutâmico
- GFP: *green fluorescent protein*
- GITR: *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*
- PD-1: *Programmed Death 1*
- GLUT2: *Glucose transporter 2*
- GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- GVHD: Doença do enxerto contra o hospedeiro
- HE: hematoxilina eosina
- HGF: *Hepatocyte growth factor*
- HLA: *human leukocyte antigen system*
- HSC: Células-tronco hematopoéticas
- IA-2: *tyrosine phosphatase-like protein*
- ICAM: *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*

- IDO: *indoleamine 2,3-dioxygenase*
- IFN- γ : interferon gama
- IFR4: *Interferon regulatory factor 4*
- IgE: Imunoglobulina E
- IgG: imunoglobulina G
- IL: interleucina
- IPEX: *Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, and Enteropathy, X-link*
- ISCT: Sociedade Internacional de Terapia Celular
- IVIS: sistema de imagem in vivo
- KDR: *Kinase insert domain receptor*
- LFA-3: *lymphocyte function-associated antigen-3*
- LNP: linfonodo pancreático
- MHC-I: complexo de histocompatibilidade principal classe I
- MHC-II: complexo de histocompatibilidade principal classe II
- MSC: células estromais mesenquimais
- NFAT: *Nuclear factor of activated T-cells*
- NK: *natural killer*
- NO: óxido nitro
- NOD: *non obese diabetic*
- PBMC: Células mononucleares de medula óssea
- PBS: tampão fosfato tamponado
- PD-1: *Programmed Death 1 Ligand*
- PDX-1: *Pancreatic and duodenal homeobox 1*
- PE: ficoeritrina
- PERCP: peridina clorofila-a
- PHA: phytohemagglutinin
- PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
- ROR- γ t: *RAR-related orphan receptor gamma*
- SCID: imunodeficiência combinada grave
- SCID: *Severe combined immunodeficiency*
- SFB: soro fetal bovino
- SNC: Sistema nervoso central
- SSC: side scatter
- STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription protein*
- STZ: estreptozotocina
- T CD4⁺: linfócitos T CD4⁺
- T CD8⁺: linfócitos T CD8⁺

- TA: temperatura ambiente
- t-bet: *T box expressed in T cells*
- Tc17: Linócitos T CD8 produtores de IL-17
- TCR: receptor de células T
- TCR: Receptor de células T
- TGF- β : fator de crescimento transformante
- Th: Resposta immune de linfócitos T helper (auxiliar)
- Th1: linfócitos T helper (auxiliar) do tipo 1
- Th17: linfócitos T helper (auxiliar) do tipo 17
- Th2: linfócitos T helper (auxiliar) do tipo 2
- TNF-R: Receptor do fator de necrose tumoral
- TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
- Tregs: células T reguladoras
- VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*
- WT: *wild type* (tipo selvagem)
- α -MEM: *α -modified Eagle's medium*

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução..... | 22 |
| 1.1. Diabetes Mellitus do Tipo 1 | 22 |
| 1.2. Células T reguladoras e doenças autoimunes..... | 27 |
| 1.3. Células T produtoras de IL-17 e doenças autoimunes..... | 30 |
| 1.4. Células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs)..... | 36 |
| 1.4.1. Propriedades imunomoduladoras das MSCs | 37 |
| 1.4.2. Transplante de MSCs no diabetes experimental | 42 |
| 2. Objetivos | 45 |
| 2.1. Objetivos gerais | 46 |
| 2.2. Objetivos específicos | 46 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 47 |
| 3.1. Indução do diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina (STZ) em camundongos C57BL/6 | 48 |
| 3.2. Monitoramento da glicemia | 48 |
| 3.3. Análises histológicas do pâncreas | 48 |
| 3.4. Reações de imunohistoquímica do pâncreas..... | 48 |
| 3.5. Obtenção de esplenócitos de camundongos controles e tratados com STZ..... | 49 |
| 3.6. Obtenção de linfócitos dos linfonodos pancreáticos de camundongos controles e tratados com STZ..... | 49 |
| 3.7. Imunofenotipagem das populações celulares do baço e linfonodos pancreáticos de camundongos controles e tratados com STZ..... | 49 |
| 3.8. Detecção da produção de IL-17 por linfócitos T | 51 |
| 3.9. Dosagem de citocinas do homogenato pancreático..... | 52 |
| 3.10. Isolamento das células estromais mesenquimais (MSCs) de medula óssea humana..... | 52 |
| 3.11. Imunofenotipagem de MSCs humanas derivadas de medula óssea | 53 |
| 3.12. Diferenciação das MSCs em adipócitos e osteócitos | 53 |
| 3.13. Infusão de MSCs em camundongos C57BL/6 tratados com STZ..... | 54 |
| 3.14. Teste de Tolerância à Glicose | 54 |
| 3.15. Coleta e congelamento do pâncreas | 55 |
| 3.16. Reações de imunofluorescência do pâncreas..... | 55 |
| 3.17. Quantificação da região marcada por imunofluorescência | 55 |
| 3.18. Análise dos dados..... | 55 |

| | |
|--|------------|
| 4. Resultados | 56 |
| 4.1. <i>Caracterização das populações de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 no modelo de diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina (STZ).</i> | 57 |
| 4.1.1. <i>Padronização do modelo de diabetes quimicamente induzido por STZ: Evolução da hiperglicemia e peso corpóreo</i> | 57 |
| 4.1.2. <i>Comparação entre animais tratados e não tratados com STZ, em relação às análises histopatológicas e possíveis mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão do diabetes experimental.</i> | 62 |
| 4.1.2.1 <i>Análises do período de 6 dias após o tratamento com STZ</i> | 63 |
| 4.1.2.2. <i>Análises do período de 11 dias após o tratamento com STZ</i> | 77 |
| 4.1.2.3. <i>Análises do período de 18 dias após o tratamento com STZ</i> | 90 |
| 4.1.2.4. <i>Análises do período de 25 dias após o tratamento com STZ</i> | 103 |
| 4.2. <i>Avaliação do potencial terapêutico das MSCs humanas no diabetes experimental</i> | 117 |
| 4.2.1. <i>Estabelecimento das culturas de MSCs humanas derivadas de medula óssea</i> | 118 |
| 4.2.2. <i>Caracterização imunofenotípica das MSCs humanas derivadas na medula óssea</i> | 119 |
| 4.2.3. <i>Avaliação do potencial de diferenciação das MSCs em adipócitos e osteócitos</i> | 122 |
| 4.2.4. <i>Transplante das MSCs humanas em camundongos C57BL/6 diabéticos.</i> | 123 |
| 4.2.4.1. <i>Avaliação das taxas glicêmicas dos camundongos após infusão MSCs humanas</i> | 123 |
| 4.2.4.2. <i>Teste tolerância a glicose</i> | 128 |
| 4.2.4.3. <i>Análises histológicas do pâncreas dos animais tratados ou não tratados com MSCs.</i> | 130 |
| 4.2.4.4. <i>Avaliação da massa de células beta produtoras de insulina</i> | 131 |
| 4.2.4.5. <i>Avaliação da massa de células alfa produtoras de glucagon</i> | 132 |
| 5. Discussão | 137 |
| 6. Conclusões | 162 |
| 7. Referências | 165 |
| 8. Anexo | 178 |

1. Introdução

1. Introdução

1.1. *Diabetes Mellitus do Tipo 1*

As doenças autoimunes (DAIs) constituem um grupo heterogêneo de doenças que afetam 3-5% da população geral. Essas doenças decorrem de defeitos nos mecanismos que medeiam a tolerância imune aos tecidos próprios, resultando na ativação de mecanismos efetores celulares e humorais, e subsequente destruição tecidual. As DAIs são determinadas pela interação entre fatores genéticos, fatores ambientais e alteração dos mecanismos de imunorregulação. As DAIs são classificadas como “órgão-específicas” (por exemplo, *diabetes mellitus* tipo 1, esclerose múltipla, tireoidite de Hashimoto e doença de Crohn) ou como “sistêmicas” (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, artrite reumatóide), dependendo se a resposta autoimune é dirigida à antígenos que são particulares de um determinado órgão ou se são amplamente distribuídos por todo o corpo, respectivamente (Sakaguchi, 2000).

O diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1) é uma doença autoimune órgão-específica, mediada por células T e é caracterizada pela destruição seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina. É considerada uma doença crônica severa que se manifesta em cerca de 90% dos casos na infância e de 5% a 10% na fase adulta. Recentemente, têm se verificado um aumento da incidência do DM-1 em nível mundial, cerca de 2% a 5% por ano, com acometimento de crianças cada vez mais novas. No total, há entre 10 e 20 milhões de pessoas afetadas em todo mundo contribuindo para os gastos sócio-econômicos referentes à intervenção médica necessária ao tratamento desta patologia (revisado por Waldron-Lynch et al., 2009).

O início dos sinais clínicos do DM-1 ocorre quando mais de 80% das células β tenham sido destruídas. Entretanto, o nível de intensidade de perda de células produtoras de insulina pode ser menos severo do que esse valor, sendo muito variável a correlação entre este índice e o início da manifestação dos sintomas da doença (Klinke et al., 2008). O processo destrutivo das células β leva à falta do hormônio insulina, que resulta num estado de hiperglicemia, devido ao aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captura de glicose da circulação. Na ausência de insulina, também ocorre um aumento da quebra de gordura e da oxidação de ácidos graxos, que resulta numa excessiva produção de cetonas. Se não tratados, os distúrbios metabólicos levam progressivamente à depressão do sistema nervoso central, coma e morte. Assim, pacientes necessitam de tratamento permanente com insulina exógena

para sobrevivência. Algumas complicações crônicas graves incluem os problemas vasculares que levam à insuficiência renal, cegueira, doença cardíaca e úlceras crônicas (revisado por Notkins et al., 2002).

O DM-1 é tratado pela terapia convencional com insulina ou terapia intensiva com insulina. Ensaios clínicos de tratamentos com ciclosporina, azatioprina/corticóides, ou anticorpo monoclonal anti-CD3, visando à preservação funcional das células β , vêm sendo realizados com resultados significativos, mas insuficientes para aplicação clínica rotineira (Palmer et al., 2004). Mais recentemente, o transplante de ilhotas pancreáticas vem sendo proposto como alternativa terapêutica para o DM-1 (Notkins et al., 2002). Entretanto, há limitações nesse tipo de transplante, as quais incluem a baixa quantidade de doadores para transplantes alogênicos, dificuldade de obtenção das ilhotas pancreáticas e a necessidade de imunossupressão constante (Atkinson & Eisenbarth., 2001). Esse cenário estimula novas pesquisas em busca de alternativas terapêuticas, tais como a diferenciação *in vitro* de células-tronco em células β humanas para posterior transplante e tratamento com células-tronco adultas. (Hussain & Theise, 2004; Voltarelli et al., 2007).

A suscetibilidade ao DM-1 é determinada por fatores genéticos, ambientais e disfunção dos processos de imunorregulação. O locus do HLA no cromossomo 6 tem sido bastante associado ao DM-1. Duas combinações dos genes (haplótipos) são de particular importância, DR4-DQ8 e DR3-DQ2, que estão presentes em 90% das crianças com DM-1. Um terceiro haplótipo, DR15-DQ6, é encontrado em menos de 1 % das crianças acometidas pela doença, enquanto que na população em geral essa frequência é de 20%, sendo, portanto, considerado um haplótipo de proteção. A combinação de dois haplótipos de suscetibilidade (DR4-DQ8/DR3-DQ2) contribui para um grande risco da doença e é mais comum em crianças que desenvolvem a doença mais precocemente. Outro gene candidato de estudos é o gene da insulina, localizado no cromossomo 11, sendo o segundo mais importante fator genético de suscetibilidade, que contribui com cerca de 10% da suscetibilidade genética ao DM-1 (Gillespie et al., 2006). Outros genes associados com doenças autoimunes, tais como AIRE, CTLA-4 e Foxp3, podem também fornecer importantes informações acerca da patogênese do DM-1 (Daneman, 2006).

Alguns agentes ambientais suspeitos em desencadear o DM-1 incluem infecções virais, elementos da dieta durante a infância (p.ex. leite de vaca, cereais ou glúten), vacinação, toxinas, entre outros. Evidências de infecções por enterovírus, rubéola, caxumba, rotavírus, parvovírus ou citomegalovírus são os candidatos mais comuns por desencadear a autoimunidade contra células β pancreáticas. Estudos epidemiológicos investigando o

aparecimento de autoanticorpos de forma sazonal em um grupo de indivíduos mostraram uma prevalência desses autoanticorpos durante o inverno, correlacionando com o período de aumento de infecções por enterovírus (revisado por Atkinson & Eisembarth, 2001; Gillespie et al., 2006; Daneman et al., 2006; van der Werf et al., 2007; Dotta et al., 2007).

O estágio precoce do DM-1 é caracterizado por uma insulite, devida à infiltração das ilhotas pancreáticas por células mononucleares, incluindo linfócitos T e B, monócitos, células dendríticas e células NK (Itoh et al., 1993). Macrófagos e células dendríticas são as primeiras células a infiltrarem as ilhotas pancreáticas. Em linhas gerais, parece plausível que autoantígenos provenientes de células β sejam transportados por células apresentadoras de antígenos (APCs) aos linfonodos drenantes pancreáticos (LNP), tornando-os acessíveis aos linfócitos T autorreativos “naive” circulantes e favorecendo o subsequente influxo de linfócitos T ativados às ilhotas pancreáticas. De acordo, foi demonstrado que a remoção de LNP de camundongos NOD pré-diabéticos conferiu proteção contra a formação do processo de insulite nesses animais (Gagnerault et al., 2002). Além das APCs apresentarem antígenos das células β aos linfócitos, estas células produzem citocinas próinflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- β) e óxido nítrico, que também contribuem para a destruição das células β (Mathis & Benoist, 2001).

A identificação de células T autorreativas contra antígenos presentes nas células β pancreáticas, que incluem a insulina, o GAD (*glutamic acid decarboxylase*) e a IA-2 (*protein tyrosine phosphatase 2*), no sangue periférico de indivíduos diabéticos recém-diagnosticados, demonstrou que mecanismos de autoimunidade estão envolvidos na destruição das células β pancreáticas (Roep, 2003). A etiologia autoimune do DM-1 é também confirmada pela presença de autoanticorpos circulantes específicos contra antígenos das células β pancreáticas. Estes autoanticorpos são detectados em 85-90% dos indivíduos com DM-1 ao diagnóstico. Ainda não está claro se esses autoanticorpos participam diretamente da destruição das células β ou aparecem secundariamente devido à liberação de autoantígenos das ilhotas danificadas por outros componentes do sistema imune. Não obstante, a detecção de autoanticorpos é um potencial marcador da patogênese do DM-1, uma vez que precede o início da doença clínica, frequentemente em vários meses a vários anos, o que explica o fato dos pacientes apresentarem autoanticorpos contra vários antígenos das células β no momento em que os sintomas clínicos se tornam aparentes (Notkins, 2002).

Estudos em animais demonstraram que as células T têm um papel essencial na patogênese do DM-1. Embora ambas as células T CD4⁺ Th1 e células T CD8⁺ sejam

importantes na patogênese, trabalhos mostraram que as células T CD8⁺ citotóxicas são as principais células efetoras na destruição das células β pancreáticas. Citocinas do padrão Th1 produzidas pelas células T CD4⁺ e também por T CD8⁺ são essenciais para patogênese do DM-1, pois potencializam respostas imunes mediadas por células, incluindo a ativação de macrófagos. Basicamente, dois mecanismos celulares relacionados à imunopatogenia do DM-1 foram descritos, um associado ao reconhecimento (1) e outro associado à ativação (2). No mecanismo (1) a célula T CD8⁺ é ativada diretamente pelo reconhecimento de antígenos das células β apresentados por moléculas de MHC de classe I presentes nas próprias células β pancreáticas. A ativação das células T CD8⁺ conseqüentemente provoca a morte das células β por contato célula-célula através das vias de sinalização por Fas/FasL ou perforina/granzima. De acordo com o segundo mecanismo (2), as células T CD4⁺ ou T CD8⁺ reconhecem antígenos das células β indiretamente, apresentados por células dendríticas ou macrófagos no contexto de moléculas de MHC de classe II ou classe I, respectivamente. A ativação resultante das células T leva: a apoptose das células β mediada por células T CD8⁺ citotóxica através do contato celular (receptores de superfície Fas/FasL ou TNF-α/TNF-R) ou lise osmótica devido à ação de mediadores solúveis como granzimas e perforinas, à liberação de citocinas próinflamatórias que resulta na ativação de macrófagos com subsequente aumento de sua capacidade citotóxica devido à produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio, e à ativação de células β e estimulação da produção de mediadores de morte celular por elas mesmas (revisado Mathis & Benoist, 2001).

Muitos estudos indicam que os linfócitos B podem atuar como células apresentadoras de antígenos para o desenvolvimento de células T específicas contra antígenos de células β pancreáticas (Yanaba et al., 2008). Em estudo de Xiu e colaboradores (2008), a depleção de linfócitos B em camundongos NOD fêmeas de 5 semanas de idade, através do uso do anticorpo anti-CD20, reduziu a população de linfócitos B em mais de 95%, o que resultou em uma diminuição do processo de insulite e preveniu o desenvolvimento do diabetes em cerca de 60% dos animais depletados. Entretanto, quando a depleção de linfócitos B é feita após o início da doença (camundongos NOD 15 semanas de idade) há um atraso na progressão da doença, mas não impediu ou inibiu o seu desenvolvimento. Desta forma, a depleção de linfócitos B nesse estágio de progressão da doença pode atenuar o “*priming*” das células T autorreativas, mas o efeito não é tão significativo uma vez que um grande número de células autorreativas já estavam estabelecidas antes do tratamento com anti-CD20 (Xiu et al., 2008). Em estudo recente, Brodie e colaboradores mostraram em modelo de camundongos NOD, que

a deficiência de linfócitos B se correlacionou com diminuição da sobrevivência de células T citotóxicas infiltradas nas ilhotas e um atraso no desenvolvimento da doença. Essa diminuição da sobrevivência das células T CD8⁺ pode estar correlacionada com uma carência de citocinas produzidas por células T CD4⁺ que deveriam ter sido ativadas por linfócitos B (Brodie et al., 2008).

Apesar das intensas observações da atuação de citocinas no processo de destruição das células β , há ainda resultados controversos em diferentes modelos animais. Em camundongos, citocinas Th1 tais como IFN- γ e TNF- α parecem participar da reação imune e os danos gerados às células β e suas ações podem se potencializar com a diminuição de citocinas Th2. Já em ratos da linhagem *BB rats*, em contraste, a administração de IFN- γ inibe a autoimunidade mediada por células T. Portanto, o envolvimento do IFN- γ na destruição de células β é ainda questionável. A expressão elevada de IL-21 foi detectada no pâncreas de camundongos NOD diabéticos, sugerindo que a citocina IL-21 pode controlar a proliferação homeostática de células T autorreativas. Ainda, tem sido recentemente mostrado que camundongos NOD deficientes do receptor da IL-21 não exibem infiltrado linfocítico no pâncreas e são amplamente protegidos do desenvolvimento do diabetes (revisado Monteleone et al., 2009).

Desde o seu estabelecimento a mais de 20 anos atrás, a linhagem de camundongos NOD (*non-obese diabetic*) tem sido usada para estudar as características do diabetes autoimune experimental, pois assemelha-se clinicamente ao DM-1 em humanos. Uma diferença relevante é que a doença em camundongos NOD é totalmente determinada geneticamente e em humanos depende de fatores genéticos e ambientais. O início do diabetes ocorre entre 12 e 14 semanas após o nascimento em fêmeas e um pouco mais tarde nos machos. A maioria das células dos infiltrados inflamatórios são células T CD4⁺, mas células T CD8⁺, células NK, células B, células dendríticas e macrófagos também podem ser observadas (Anderson & Bluestone, 2005).

Além do modelo dos camundongos NODs, existe um modelo de diabetes que pode ser induzido quimicamente pela administração de estreptozotocina (STZ) em várias linhagens de camundongos. A STZ é um análogo da N-acetilglucosamina e foi primeiramente isolada do microorganismo *Streptomyces achromogenes*, sendo que em altas doses induz, quase que de imediato, uma hiperglicemia. Este composto químico é muito similar a molécula de glicose, e pode ser transportado para o interior das células via proteína transportadora de glicose 2 (GLUT2), mas ela não é reconhecida pelos demais transportadores de glicose. Isso explica a toxicidade sítio-específica em células β , uma vez que esse tipo celular apresenta altos níveis

de expressão do receptor GLUT2. Entretanto, altas doses de STZ promovem uma alta citotoxicidade, levando a uma lesão muito grave nos rins. Esse efeito pode ser reduzido pela administração de pequenas e múltiplas doses de STZ, nesse caso a hiperglicemia aparece dentro de duas semanas após a primeira dose da droga (revisado por Tesch & Nikolic-Paterson, 2006).

A evolução do diabetes no modelo quimicamente induzido com múltiplas doses de STZ é mediada por um precoce infiltrado de macrófagos nas ilhotas, uma apresentação eficiente dos antígenos diabetogênicos liberados pela droga e recrutamento de células T. Macrófagos desempenham sua função patogênica por gerar indiretamente óxido nítrico, via produção de citocinas próinflamatórias, como IL-1 β e TNF- α . Além disso, já foi demonstrado que a combinação de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e a geração de óxido nítrico são responsáveis pelo dano à célula β em um modelo de diabetes induzido por múltiplas doses de STZ em ratos *Dark Agouti* (revisado por Mensah-Brown et al., 2006).

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 são mais suscetíveis em desenvolver o diabetes induzido por múltiplas doses de STZ em comparação com camundongos Balb/c, que são relativamente resistentes. As doses de STZ afetam diferentemente os níveis de citocinas do padrão Th1 e Th2. Em estudo de Muller e colaboradores (2002) as citocinas de padrão Th1 (IFN- γ e TNF- α) e as citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) estiveram reguladas de forma linhagem-dependente. Aparentemente, a resistência ao diabetes na linhagem Balb/c esteve mais associada com o aumento da expressão das citocinas de padrão Th2 em detrimento de citocinas Th1, sendo que essas citocinas operam de maneira inversamente proporcional na suscetibilidade da doença (Muller et al., 2002).

1.2. Células T reguladoras e doenças autoimunes

As células T reguladoras (Tregs) CD4⁺CD25⁺ atuam na supressão da ativação imune, funcionando como mediadores críticos da homeostasia imune e da autotolerância (Fontenot & Rudensky, 2005). As Tregs têm um papel essencial no controle de células T autorreativas, uma vez que a depleção ou alteração da função dessas células T CD4⁺CD25⁺ levam ao desenvolvimento de doenças autoimunes em uma grande variedade de animais normais (revisado por Sakaguchi et al., 2004; Sakaguchi et al., 2006). Entretanto, vários estudos recentes têm demonstrado que a função das células Tregs não é limitada à prevenção de autoimunidade, mas são importantes no controle de diversas respostas imunes no contexto de

inflamação, infecção, alergia, transplantes e imunidade tumoral (revisado por Hori & Sakaguchi, 2004; Paust & Cantor, 2005; Randolph & Fathman, 2006).

As células Tregs naturais são, na sua maioria, CD4⁺ e expressam de maneira constitutiva a molécula CD25 (cadeia α do receptor de IL-2, IL-2R α). São produzidas normalmente pelo timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas, e constituem aproximadamente 2-10% da população de células T CD4⁺ (revisado por Sakaguchi et al., 2004). Além da geração tímica de células Tregs naturais CD4⁺CD25⁺, células T periféricas “não-Treg” podem adquirir a expressão de Foxp3 e converter-se *in vivo* em células Tregs induzidas após estimulação antigênica crônica ou em condições de linfopenia (Walker et al., 2003; Apostolou & Boehmer, 2004; Curotto de Lafaille et al., 2004;).

As células Tregs CD4⁺CD25⁺ produzem citocinas reguladoras tais como IL-10, IL-4 e TGF- β (*transforming growth factor- β*), e também expressam preferencialmente as moléculas CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, regulador negativo da ativação de células T; receptor para CD80 e CD86), GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor*) e PD-1 (*programmed death-1*). Entretanto, a identificação de Tregs durante respostas imunes ou em tecidos inflamados é complicada porque todos esses marcadores, inclusive o CD25, são também expressos em células T recém-ativadas não-reguladoras (revisado por Sakaguchi et al., 2004).

A busca por um marcador específico de células Tregs em camundongos resultou na identificação do fator de transcrição Foxp3. Foi mostrado que as células Tregs CD4⁺CD25⁺ expressam especificamente o gene regulador *Foxp3*, que codifica um fator de transcrição chamado de *forkhead transcription factor 3*, que controla seu desenvolvimento e função efetora (Fontenot et al., 2005). A expressão retroviral do gene *Foxp3* em células T periféricas CD4⁺CD25⁺ de camundongos ou humanos resultou na aquisição da função supressora por essas células, dando indícios que a expressão de Foxp3 poderia ser usada como um marcador molecular para células Tregs CD4⁺CD25⁺ (revisado por Kronenberg & Rudensky, 2005). No entanto, já é bem documentado que a maioria das células T CD4 e CD8 humanas expressam de forma transitória este fator de transcrição após ativação (Corthay, 2009). Alguns anos antes da identificação do Foxp3 como marcador específico de células Tregs, mutações no gene *Foxp3* (localizado no cromossomo X) tinham sido identificadas como causa de uma doença autoimune fatal observada em pacientes (denominada IPEX, *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) e em camundongos mutantes que desenvolvem espontaneamente esta doença autoimune (denominados *scurfy mice*). A doença se manifesta em homens, mas não em mulheres heterozigotas. No entanto, aproximadamente

50% das células T dessas mulheres não expressam Foxp3 (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001).

As Tregs têm um papel central no controle de respostas autoimunes em humanos e em modelos animais (Sury-Payer et al., 2006). De fato, a deleção de Tregs leva a expansão clonal de células T autorreativas (Danke et al., 2004). Além disso, foi observada reduzida atividade supressora de Tregs isoladas de PBMC de pacientes com esclerose múltipla (EM), DM-1, psoríase, miastenia grave, artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil e lúpus (Baecher-Allan & Hafler, 2006; Randolph & Fathman, 2006). Portanto, o fato de uma ampla variedade de DAIs apresentarem comprometimento da função e/ou frequência de Tregs é particularmente interessante e levanta a questão da existência de um denominador comum na causa das DAIs humanas. A maioria dos trabalhos investigando o papel das células T reguladoras em humanos com DM-1 não encontrou diferenças na frequência dessas células presentes no sangue periférico em comparação com indivíduos saudáveis, sendo que a identificação dessas células foi feita através da marcação do fator de transcrição Foxp3. Entretanto, a capacidade funcional das Tregs em humanos com DM-1 não está totalmente esclarecida. Dois estudos sugerem defeitos funcionais nas Tregs de pacientes, mas outros estudos reportaram atividade de supressão normal. Por outro lado, muitos estudos mostraram que citocinas pró-inflamatórias presentes no sítio inflamatório podem inibir a função supressora das Tregs ou tornar as células T efetoras resistentes a supressão exercida por estas células. Recentemente, tem sido proposto que a fonte desta regulação anormal em diabéticos tipo 1 é intrínseca ao compartimento de células T efetoras devido a resistência das células T em responderem às células T CD4⁺Foxp3⁺ (revisado por Alonso et al., 2009). Já em camundongos NOD, o defeito das Tregs parece ser simplesmente um problema numérico, uma vez que estas parecem funcionar normalmente e conferem proteção após transferência adotiva (Salomon et al., 2000; Wu et al., 2002).

Já tem sido mostrado que células Tregs Foxp3⁺ podem ser geradas fora do timo, frente a diferentes condições. Ainda não se sabe ao certo qual seria o microambiente ideal para a conversão dessas células em Tregs induzidas, entretanto já é sabido que a estimulação via TCR e a presença das citocinas IL-2 e TGF- β são requeridas para essa diferenciação tanto *in vitro* como *in vivo* (revisado por Lafaille & Lafaille, 2009). A adição de TGF- β em células T CD4⁺ naive TCR-estimuladas induz a transcrição de Foxp3, aquisição de anergia e atividade supressora da resposta inflamatória em um modelo experimental de asma (Chen et al., 2003). A citocina IL-2 também parece ter um papel fundamental na geração e homeostase de células Tregs induzidas. Experimentos utilizando neutralização de IL-2 ou células T deficientes de

IL-2 demonstraram que essa citocina é importante para a indução da transcrição de Foxp3 e da capacidade de supressão (Zheng & Rudensky., 2007). Outra diferença importante na geração de células Treg induzidas e naturais é com relação a molécula CTLA-4. A expressão aumentada de Foxp3 e a aquisição da capacidade imunossupressora adquirida por células T CD4 *naive* cultivadas com TGF- β requer um aumento da expressão do CTLA-4 (Zheng et al., 2006). Ainda não se sabe ao certo se as células Tregs induzidas geradas *in vitro* possuem a mesma capacidade supressora das células Tregs naturais, mas há um consenso que essas células, quando geradas *in vivo*, são efetivas na capacidade supressora (Lafaille& Lafaille, 2009).

Além das células T reguladoras CD4⁺, a população de células T CD8⁺ também apresenta subtipos celulares com capacidade de suprimir diferentes células do sistema imunológico. As células T reguladoras CD8⁺ (Tregs CD8⁺) foram primeiramente observadas por Gershon e colaboradores no início dos anos 70. A capacidade imunossupressora das células Tregs CD8⁺ em doenças autoimunes foi primeiramente descrita no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), onde animais deficientes de células T CD8⁺ apresentaram uma persistência crônica da doença, com alta frequência de remissões da doença (revisado por Lu & Cantor, 2008). Muitos mecanismos têm sido implicados na atividade supressora dessas células, incluindo a lise direta das células alvo (via perforina) e a secreção de citocinas supressoras pelas Treg CD8⁺ como por exemplo IL-10. Possivelmente, diferentes subtipos de células Tregs CD8⁺ utilizam diferentes mecanismos inibitórios dependendo do contexto da reação imune (revisado por Horai et al., 2007; Lu & Cantor, 2008).

1.3. Células T produtoras de IL-17 e doenças autoimunes

A população de células T *helper* (Th) CD4⁺ é subdividida em diferentes subpopulações de células (Th1, Th2 e Tregs) com base nas citocinas que elas produzem e as funções que exercem (revisado por Cooke, 2006). Quando células T *naive* respondem a uma estimulação antigênica, as citocinas presentes no meio dirigem a diferenciação dessas células. Por exemplo, quando células apresentadoras de antígenos locais produzem IL-12, especialmente na presença de IFN- γ , as células T CD4⁺ *naive* se diferenciam preferencialmente em células Th1 secretoras de IFN- γ e promovem uma resposta imune celular contra patógenos intracelulares (p.ex. bactérias intracelulares, vírus e alguns protozoários). Quando IL-4 está presente, as células T CD4⁺ se desenvolvem, preferencialmente, em células Th2 produtoras de IL-4, IL-5 e IL-13, promovendo uma

resposta humoral contra patógenos extracelulares (p.ex. helmintos), além de ativar produção de IgE por células B (revisado por Kikly et al., 2006; Harrington et al., 2006).

Recentes estudos têm mostrado a existência de uma terceira população de células T *helper* CD4⁺, as quais produzem IL-17 e exibem funções distintas das células Th1 e Th2. Estas células T têm sido nomeadas de células Th17 com base na sua produção de IL-17A e IL-17F, uma vez que estas citocinas não são produzidas nem por células Th1 nem por células Th2. A citocina IL-17 possui diversas atividades biológicas, sendo as mais conhecidas de recrutar neutrófilos, induzir a produção de quimiocinas, recrutar e promover a sobrevivência de macrófagos e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos por uma variedade de células imunes e não imunes (revisado por Crome et al., 2009). Desta forma, uma importante implicação dessas células Th17 parece estar associada ao combate de possíveis patógenos que não foram eliminados de forma eficiente pelas células Th1 ou Th2 (Korn et al., 2009).

Nos últimos cinco anos, muitas informações acerca desse novo subtipo celular têm sido acumuladas. As citocinas responsáveis por sua diferenciação e expansão têm sido identificadas, bem como os fatores de transcrição envolvidos na sua geração, caracterizando as células Th17 como uma linhagem de células T *helper* independente, tanto em humanos quanto em camundongos (Korn et al., 2009). No ano de 2006, três estudos independentes observaram que a combinação das citocinas TGF- β e IL-6 é necessária para a diferenciação de uma célula T *naive* no padrão Th17 em camundongos (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006 e Veldhoen et al., 2006). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que facilita a geração de uma resposta imune adaptativa e suprime o desenvolvimento de células Tregs. Desta forma, animais deficientes de IL-6 não são capazes de montar uma resposta imune adaptativa e são resistentes a várias doenças autoimunes. Por outro lado, TGF- β é uma citocina com funções imunossupressoras, uma vez que ela regula e inibe respostas imunes inatas e adaptativas, incluindo a diferenciação de células Th1 e Th2 (Wahl & Chen, 2005). Em estudo recente, Das e colaboradores mostraram que o TGF- β não age diretamente na organização molecular durante a diferenciação das células Th17, mas sim na inibição da diferenciação das células Th1 e Th2. Essa citocina inibe a expressão dos fatores de transcrição STAT-4 (Th1) e GATA-3 (Th2), mas não exerce influência direta sobre ROR- γ t. Após inibição de STAT-4 e GATA-3 pelo TGF- β , a citocina IL-6 aumenta a expressão de ROR- γ t promovendo a diferenciação de células T CD4⁺ *naive* em células Th17 (Das et al., 2009). Inicialmente, vários estudos sugeriram que a IL-23 induzia a diferenciação das células Th17 murinas, mas hoje já se sabe que esta citocina não é essencial para a diferenciação das células Th17, uma

vez que as células T *naive* não expressam o receptor de IL-23 (IL-23R). Estudos têm mostrado que a presença de TGF- β juntamente com IL-6 possivelmente promova uma regulação positiva da expressão de IL-23R em células Th17, permitindo que a IL-23 atue a manutenção, expansão e sobrevivência do fenótipo das células Th17 murinas (revisado por Louten et al., 2009).

As citocinas necessárias para diferenciação das células Th17 em seres humanos ainda não estão totalmente definidas. Estudos iniciais sugeriam que a presença de IL-1 β , IL-6 e/ou IL-23 era suficiente para induzir a diferenciação de células T *naive* em Th17 e que o TGF- β inibia este processo. (revisado por Crome et al., 2009). Estudos subsequentes, entretanto, mostraram que o TGF- β é importante para a diferenciação das células no padrão Th17 e em 2009, Santarlasci e colaboradores, mostraram que o TGF- β atua de forma indireta na diferenciação das células Th17 humanas *in vitro*, promovendo a inibição do desenvolvimento de células de padrão Th1 (Santarlasci et al., 2009). Enquanto a IL-23 parece estar envolvida apenas na expansão de células Th17 murinas, em humanos, a maioria dos estudos mostrou um papel central da IL-23 em promover a diferenciação de células Th17 de forma direta (Volpe et al., 2009).

As células Th17 não expressam os fatores de transcrição GATA-3 (Th2) ou T-bet (Th1), mas sim o fator de transcrição ROR- γ t que está expresso em células Th17 diferenciadas *in vitro* e em células produtoras de IL-17 presentes na lâmina própria de camundongos *naive*, sugerindo desta forma que o fator ROR- γ t é necessário para a diferenciação do padrão Th17 (Ivanov et al., 2006). Camundongos deficientes de ROR- γ t apresentam números reduzidos de células produtoras de IL-17, mas estas não estão totalmente ausentes. Esse fato pode ser explicado pela presença de outro fator de transcrição da família de receptores nucleares retinóicos, o ROR- α , que é seletivamente expresso em células Th17 e é muito similar ao ROR- γ t. Entretanto, o mecanismo pelo qual esses dois fatores de transcrição (ROR- γ t e ROR- α) regulam a produção de IL-17 não está totalmente esclarecido. Embora haja um possível sítio de ligação do ROR no promotor da IL-17, não está claro se isso realmente acontece (revisado por Martinez et al., 2008). Outro fator de transcrição necessário para a diferenciação das células Th17 é o STAT-3, uma vez que a expressão de ROR- γ t é dependente de STAT-3 e o próprio STAT-3 é capaz de se ligar ao promotor de IL-17 e IL-21 e promover sua expressão. Desta forma, ROR- γ t e STAT-3 cooperam de maneira sinérgica, sendo que a produção ótima de IL-17 depende da expressão de ambos os fatores de transcrição (Yang et al., 2007). Outros fatores de transcrição ainda estão sendo descritos como importantes na diferenciação das células Th17, como por exemplo, o IRF4 (*interferon*

regulatory factor 4) pois camundongos deficientes de IRF4 são incapazes de montar resposta do padrão Th17 (Brustle et al., 2007).

Tendo em vista que o TGF- β é necessário tanto para a geração de células Tregs Foxp3⁺ fora do timo (Tregs induzidas) quanto para células Th17, pode-se propor uma relação íntima entre esses dois tipos celulares. Um ponto interessante é a necessidade da participação de TGF- β , uma citocina de propriedades imunossupressora, para promover a diferenciação de uma célula Th17 de características pró-inflamatórias. Em termos funcionais, a necessidade da presença de TGF- β tanto para a indução de células Tregs induzidas quanto de células Th17, parece ser um sistema de balanço eficiente entre tolerância e imunidade. Em estado de equilíbrio, TGF- β induz a expressão de Foxp3 e desenvolvimento de células T reguladoras, inibindo a inflamação e mantendo a autotolerância. Por outro lado, na presença de agentes microbianos, a citocina IL-6 é produzida levando a inibição do desenvolvimento de Tregs e induzindo a geração de células Th17 com alta capacidade pró-inflamatória. Já em nível molecular, o balanço entre Tregs e células Th17 é mantido pela indução de Foxp3 ou ROR- γ t, bem como a associação física desses dois fatores de transcrição no microambiente nuclear (revisado por Korn et al., 2009). O TGF- β é capaz de induzir tanto o fator de transcrição Foxp3 quanto ROR- γ t. O fator Foxp3 é capaz de se associar diretamente com ROR- γ t, impedindo que este último atue como fator de transcrição, mas que na presença de IL-6 essa associação é rompida, permitindo que ROR- γ t se ligue ao DNA e inicie a diferenciação das células Th17 (Zhou et al., 2008).

As células Th17 exercem um importante papel na defesa do organismo contra certas bactérias extracelulares e fungos, entretanto, nos últimos anos, têm surgido várias evidências da participação dessas células nas patologias autoimunes. Várias condições autoimunes, previamente estabelecidas como desordens mediadas por células Th1, podem envolver também as células Th17. Estudos mostram que células Th17 murinas têm um papel essencial na patogênese de modelos experimentais de artrite reumatóide e esclerose múltipla. Além disso, a neutralização de IL-17 e a deficiência de IL-23 protegem os camundongos contra EAE e AIC. (Kikly et al., 2006; Cooke, 2006; Bettelli et al., 2006, Bettelli et al., 2007).

Em humanos, alguns trabalhos mostraram o papel das células Th17 no desenvolvimento de algumas DAIs. Os níveis de IL-17 estão elevados em várias condições autoimunes incluindo psoríase, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide e esclerose múltipla (Crome et al., 2009). Evidências iniciais do potencial patogênico das células Th17 na artrite reumatóide foram mostradas por Chabaud e colaboradores em 1999, onde a concentração da citocina IL-17 estava aumentada no soro e no fluido sinovial de pacientes

com artrite reumatóide (Chabaud et al., 1999). Não obstante, Matusevicius et al. (1999) demonstraram que 40% dos pacientes com EM apresentam números elevados de células mononucleares positivas para mRNA de IL-17A no sangue periférico e no líquido, comparando-se com controles (Matusevicius et al., 1999). Análises de expressão gênica por microarrays de placas desmielinizantes isoladas durante autópsias de pacientes com EM demonstraram um aumento de 18 vezes nos níveis de RNAm de IL-17 quando comparado aos níveis encontrados em pacientes controles sem anormalidades no sistema nervoso (Lock et al., 2002). Em adição, Vaknin-Dembinsky e colaboradores (2006) demonstraram que células T CD4⁺ de pacientes com EM, quando estimuladas com anti-CD3 *in vitro*, produzem significativamente mais IL-17 do que células T CD4⁺ de controles saudáveis (Vaknin-Dembinsky et al., 2006). Entretanto, ainda não está claro se a IL-17 atua diretamente na destruição da bainha de mielina ou age de forma indireta no recrutamento outras células do sistema imunológico. As células endoteliais da barreira hemato-encefálica de pacientes com esclerose múltipla expressam receptores para IL-17 e a exposição dessas células a IL-17 reduz a expressão de proteínas de junção celular e aumenta a transmigração de células T CD4⁺. Portanto, o principal mecanismo prejudicial da IL-17 parece ser danificar a barreira hemato-encefálica, permitindo o acesso de células T mielina-específicas a este local anteriormente imuno-privilegiado (Kébir et al., 2007).

Uma possível participação de células Th17 no desenvolvimento do diabetes é sugerida pela observação de que a IL-23 induz exacerbação e rápida progressão da doença quando administrada em conjunto com múltiplas doses diabetogênicas de estreptozotocina (Mensah-Brown et al., 2006). No entanto, ainda não se sabe se as células Th17 e as citocinas IL-23 e IL-17 apresentam um papel crítico e determinante na suscetibilidade ao desenvolvimento de diabetes autoimune. Emmanuelle e colaboradores, em 2009, descreveram que as células Th17 possivelmente regulam o desenvolvimento do diabetes em camundongos NODs. Neste estudo, a neutralização da IL-17 impediu o desenvolvimento da doença. No entanto, os autores mostraram que essas células não participam diretamente da destruição das células beta, e estão mais envolvidas nos processos mais tardios da resposta autoimune. (Emmanuelle et al., 2009). Em outro estudo, Martin-Orozco mostraram que células Th17 de camundongos BDC2.5 diferenciadas *in vitro* se diferenciaram em células Th1 quando injetadas em recipiente linfopênico (NOD.scid) e foram responsáveis pelo desenvolvimento e severidade da doença (Martin-Orozco et al., 2009). De forma similar, Bending e colaboradores mostraram que células Th17 altamente purificadas e isoladas de camundongos BDC2.5 promoveram a indução e o desenvolvimento do diabetes quando transplantadas em

camundongos NOD.scid após se converterem em células produtoras de IFN- γ . Esses dados sugerem um potencial de plasticidade das células Th17, pois mesmo após diferenciação estas tiveram a capacidade de se converterem em outro subtipo celular (Th1) (Bending et al., 2009).

Culturas de células T CD8⁺ em condições de cultivo que polarizam a diferenciação de células Th17 (IL-6/IL-23 + TGF- β) promovem a produção de IL-17 pelas células T CD8⁺, entretanto, as características fenotípicas e funcionais destas células ainda não estão estabelecidas. Estas células T CD8⁺ que produzem IL-17 são denominadas de células Tc17 e são naturalmente encontradas nos pulmões e mucosas digestivas, paralelamente à distribuição das células Th17, só que em menores frequências (Kryczek et al., 2007). Ciric e colaboradores (2009) demonstraram que a sinalização via IL-23 é necessária para maturação e aquisição das funções efetoras das células Tc17. Este estudo mostrou a presença de duas subpopulações bem definidas de células Tc17, as que são patogênicas e as não-patogênicas, e essa diferença está na capacidade das células Tc17 em atrair outras células do sistema imunológico através de distintos padrões de mediadores solúveis secretados (Ciric et al., 2009).

Yen e colaboradores mostraram em 2009 que o fator de transcrição STAT-3 e ROR- γ t parecem ser importantes na polarização das células Tc17 e que estas células não expressam granzima B quando diferenciadas *in vitro*, tornando-as incapazes de lisar células-alvo nos ensaios de citotoxicidade. Entretanto, após transferência adotiva de células Tc17 HA-específicas e altamente purificadas para camundongos transgênicos C3HA, as células Tc17 apresentaram perda da expressão de IL-17 e aquisição da expressão de IFN- γ , além de contribuir para aumento da inflamação pulmonar após transferência (Yen et al., 2009). Huber e colaboradores (2009) mostraram a presença das células T CD8⁺ produtoras de IL-17 no modelo de encefalomielite autoimune experimental. Os pesquisadores induziram a doença em camundongos e analisaram a população de células T CD8⁺ do sistema nervoso central e linfonodos drenantes destes animais quanto à produção de IL-17, IFN- γ e expressão de granzima, durante a fase inicial assim como no pico da doença. As células T CD8⁺ produtoras de IL-17 puderam ser detectadas durante o período de indução e também na progressão da doença, entretanto nenhuma destas células coexpressavam granzima B, sugerindo que a população de células T CD8⁺ IL-17⁺ é diferente da população de células T citotóxicas convencionais (Huber et al., 2009).

1.4. Células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs)

A medula óssea contém, além das células-tronco hematopoéticas, precursores de linhagens não-hematopoéticas que incluem as células-tronco mesenquimais. As células-tronco mesenquimais foram descritas pela primeira vez há mais de 40 anos atrás, por Friedenstein e colaboradores (1968) e a partir daí diversos pesquisadores descreveram essas células isoladas da medula óssea como uma população de células aderentes, que possui uma morfologia fibroblastóide e capacidade de diferenciar-se *in vitro* em osso, cartilagem, gordura, tendão e músculo (revisado por Covas et al., 2006). Essas células constituem uma população rara de progenitores multipotentes que contribuem para a homeostase tecidual, na regeneração de tecidos mesenquimais, tais como osso, cartilaginosa, muscular, adiposo, ligamento, tendão, estroma medular, além de exercerem um papel fundamental na hematopoese (revisado por Pittenger et al., 1999). Recentemente, alguns trabalhos mostraram a capacidade dessas células de se diferenciarem em células além da linhagem mesodérmica, como células das linhagens endodérmica e neuroectodérmica, incluindo neurônios, hepatócitos e células endoteliais (revisado por Bernardo et al., 2009). Nos últimos anos, uma nomenclatura para renomear as células-tronco mesenquimais têm sido proposta, e o termo células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) foi introduzido durante reunião da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) para se referir a essa população de células aderentes ao plástico, de morfologia fibroblastóide e capacidade multipotencial de diferenciação (Horwitz et al., 2005).

As MSCs humanas foram primeiramente identificadas na medula óssea pós-natal e a partir daí em uma variedade de outros tecidos, incluindo músculo, tecido adiposo, cordão umbilical, veias e artérias, polpa dentária e diversos tecidos fetais como medula óssea, fígado, baço. O líquido amniótico e a placenta têm se mostrado ricas fontes de MSCs, sendo que tanto MSCs fetais quanto maternas podem ser isoladas da placenta (revisado por Covas et al., 2006; Bernardo et al., 2009). A frequência das MSCs presentes na medula óssea humana está estimada em cerca de 0,001% a 0,1% (Pittenger et al., 1999). Entretanto, a quantidade das MSCs na medula óssea decresce com a idade, sendo que no recém nascido a frequência é de 1 MSC em 10.000 células nucleadas e em uma pessoa de 80 anos essa frequência passa para cerca de 1MSC em 1.000.000 células da medula (revisado por Covas et al. 2006)

As MSCs são de fácil isolamento, expansão e cultivo, além de terem a capacidade de se diferenciarem *in vitro* em outros tipos celulares (Ucelli et al., 2008). Elas caracterizam-se pela ausência de expressão de marcadores de linhagens hematopoéticas tais como CD34, CD45, CD14, glicoforina A, e pela expressão média/alta de vários marcadores celulares tais

como CD44, CD29, CD51/61, CD13, CD54, CD90, CD49e, CD73, CD105, CD166, CD271, CD140b, STRO e KDR, bem como algumas moléculas de adesão essenciais envolvidas na interação com células T, como VCAM-1, ICAM-1, e LFA-3 (Covas et al., 2006). Elas expressam MHC de classe I e não expressam MHC de classe II, também não expressam moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 e CD86, e apresentam, portanto, um fenótipo hipoimunogênico (Le Blanc & Ringden, 2005). Desse modo, é sugerido que as MSCs escapam da vigilância do sistema imune por possuírem antígenos de superfície que são pobremente reconhecidos pelas células T alorreativas e células NK. Sendo assim, trabalhos da literatura sugerem que elas possam ser transplantadas de forma alogênica, autóloga e até mesmo xenogênica (Zhang et al., 2005; Vieira et al., 2008; Kerkis et al., 2008). Alguns estudos recentes têm demonstrado experimentalmente a hipoimunogenicidade das MSCs, pois mostraram que a infusão de MSCs humanas em modelos animais imunocompetentes não levou à rejeição das mesmas e proporcionou bons resultados terapêuticos (Kerkis et al., 2008; Vieira et al., 2008). Desta forma, estes estudos têm fundamentado a aplicação terapêutica de MSCs alogênicas/xenogênicas em terapias celulares. Com base em suas propriedades imunológicas e regenerativas, a literatura sugere que as MSCs alogênicas possam ser aplicadas terapêuticamente na indução de tolerância em transplantes e no tratamento de doenças autoimunes humanas, mesmo na ausência de imunossupressão concomitante. No entanto, em 2006 um trabalho mostrou que MSCs alogênicas foram rejeitadas *in vivo* em condições alogênicas (Nauta et al., 2006a).

1.4.1. Propriedades imunomoduladoras das MSCs

As MSCs apresentam propriedades importantes de imunossupressão e imunorregulação, tanto em *in vitro* quanto *in vivo*. A capacidade de imunomodulação das MSCs, bem como células-alvo e moléculas envolvidas neste processo podem ser visualizados na Figura 1. As MSCs apresentam a capacidade de modular a função de várias populações celulares do sistema imune (Uccelli et al., 2006; da Silva Meirelles et al., 2008; Uccelli, 2008). Di Nicola e colaboradores mostraram que a proliferação de células T humanas, estimuladas pela adição de linfócitos alogênicos irradiados e células dendríticas ou por fitohemaglutinina (mitógeno), foi significativamente suprimida quando as culturas também continham MSCs (Di Nicola et al., 2002). Corroborando esses achados, Le Blanc e colaboradores também mostraram que as MSCs exerceram um efeito imunossupressor em culturas mistas de linfócitos, onde em elevadas proporções as MSCs não só suprimiram a alorreatividade das

células T como também reduziram a proliferação dos linfócitos causada por fitohemaglutinina (Le Blanc et al., 2003).

Além de atuarem sobre linfócitos T, outros trabalhos mostraram que as MSCs exercem uma regulação geral sobre as respostas imunes, atuando também sobre outras células do sistema imune inato e adaptativo (Aggarwal & Pittenger, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que MSCs interferem na diferenciação, maturação e função de células dendríticas (Maccario et al., 2005; Nauta et al., 2006b). Outro mecanismo pelo qual as MSCs modulam a resposta imune é através da indução de células T reguladoras, onde já foi mostrado um aumento da população de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em coculturas de células mononucleares de sangue periférico com MSCs (Nauta & Fibbe, 2007). As MSCs regulam também a atividade de células NK (Buhring et al., 2006) e proliferação de células B (Deng et al., 2005).

Os mecanismos responsáveis por esses efeitos de imunossupressão pelas MSCs ainda não estão completamente entendidos, mas demonstram que tanto o contato célula-célula como a produção de fatores solúveis estejam envolvidos. Dentre os fatores solúveis na imunossupressão pelas MSCs, destacam-se:IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase), óxido nítrico, TGF- β 1, IL-10, HGF e a prostaglandina E2 (PGE2) (revisado por da Silva Meirelles et al., 2008).

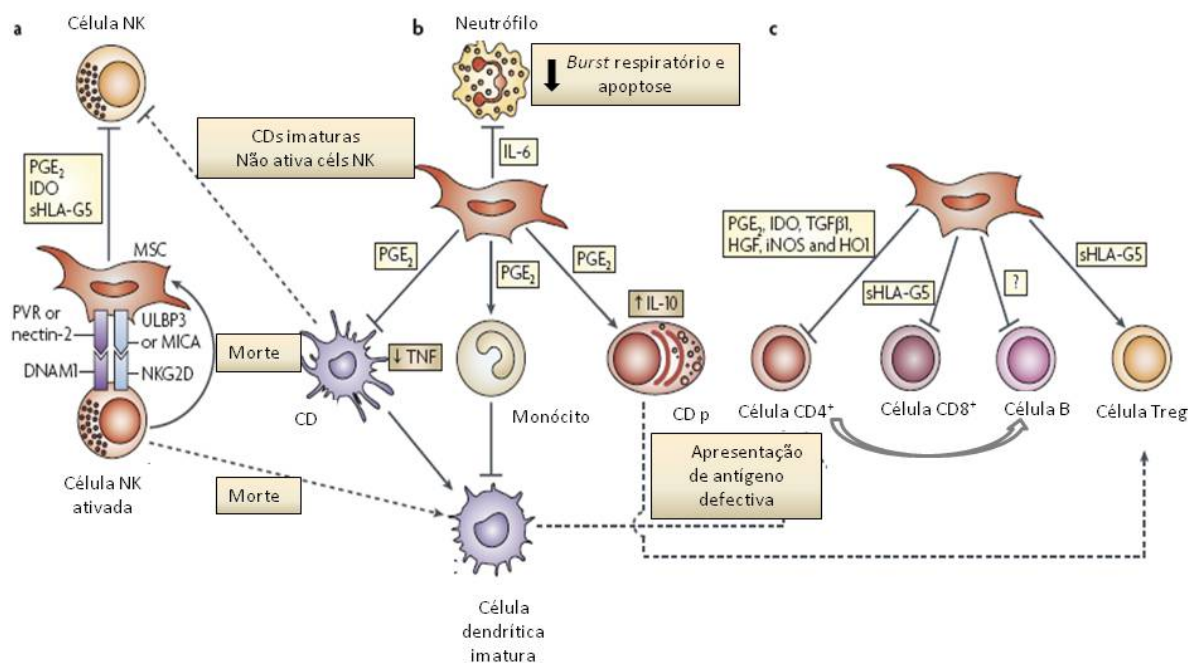


Figura 1. Possíveis mecanismos de interação entre MSCs e as células do sistema imunológico.

(a) MSCs podem inibir a proliferação e citotoxicidade de células natural killer (NK), bem como sua produção de citocinas in vitro. Estes efeitos são mediados pela prostaglandina E2 (PGE_2), indoleamina 2-3, deoxigenase (IDO) e HLA-G5 solúvel (sHLA-G5) secretados pelas MSCs. A morte das MSCs por células NK ativadas por citocinas envolve a interação do receptor NKG2D expresso nas células NK com seu ligante ULBP3 ou MICA expressos nas MSCs, bem como a interação da molécula DNAM1 das células NK com os receptores de pailovírus (PVR) ou receptor de nestina-2 nas MSCs. (b) As MSCs inibem a diferenciação dos monócitos em células dendríticas mielóides imaturas (CDs), desviando o estado de células dendríticas maduras para imaturas, inibindo a produção de TNF- α por CDs e aumentando a produção de IL-10 por células dendríticas plasmocitoides (CDp). PGE_2 secretada pelas MSCs está envolvida em todos estes efeitos. As CDs imaturas são suscetíveis à morte por células NK ativadas por citocinas. O efeito das MSCs sobre as CDs compromete a apresentação de antígenos à células T, as quais não proliferam e não promovem a expansão clonal. Além disso, as MSCs deprimem o burst respiratório e retardam a apoptose espontânea de neutrófilos via secreção constitutiva de IL-6. (c) A inibição direta das funções das células T CD4+ pelas MSCs depende da liberação de diversas moléculas solúveis pelas MSCs, incluindo PGE_2 , IDO, TGF- β (transforming growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), iNOS (inducible nitric-oxide synthetase) e HO1 (haem oxygenase-1). Ativação defectiva de células T CD4+ prejudica a função de auxiliar a proliferação de células B e produção de anticorpos. A inibição da citotoxicidade das células T CD8+ e a diferenciação de células T reguladoras (Tregs) estão relacionadas com a produção de sHLA-G5 pelas MSCs. Além disso, o aumento da expressão de IL-10 pelas pCDs resultam em um aumento da geração de células Tregs através de um mecanismo indireto. A inibição direta das células B pelas MSCs parece ser dependente de fatores solúveis e contato célula-célula, mas esses mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos. (Adaptado de Ucceli et al., 2008)

Os efeitos imunomoduladores das MSCs têm sido estudados em uma ampla variedade de modelos animais. Um dos primeiros estudos *in vivo* demonstrou que a infusão sistêmica de MSCs derivadas de medula óssea de babuínos prolongava a sobrevivência de enxertos de pele alogênicos (Bartholomew et al., 2002). O efeito *in vivo* imunossupressor das MSCs foi observado no tratamento da doença do enxerto-contrá-hospedeiro (GVHD). Nesse trabalho, a infusão sistêmica de MSCs derivadas de tecido adiposo e expandidas *ex vivo* foram eficientes no controle do GVHD desenvolvida em camundongos após o transplante de células-tronco hematopoéticas haploidenticas (Yanez et al., 2006). Além do GVHD, foi mostrado que o uso de MSCs em modelos de EAE (encefalomielite autoimune experimental) induziu uma tolerância periférica de células T contra antígenos próprios (Nauta & Fibbe, 2007). Deng e colaboradores (2005) mostraram em um modelo animal de lúpus eritematoso (camundongos BXSB), que MSCs alogênicas foram capazes de inibir a autorreatividade de linfócitos B e T, promovendo uma melhora dos sinais e sintomas da doença (Deng et al., 2005).

Além da modulação de respostas imunes, outra propriedade interessante das MSCs consiste em sua capacidade de migração para um sítio de injúria tecidual, após administração intravenosa, o que proporciona a sua utilização como terapia celular em diversas doenças (Tabela 1). O interesse crescente na utilização das MSCs para a medicina regenerativa e para a engenharia de tecidos deve-se à sua multipotencialidade, fácil isolamento a partir de inúmeros tecidos sua capacidade de migração *in vivo* e potencial de regeneração tecidual. Além disso, as MSCs secretam um largo espectro de moléculas bioativas (citocinas ou fatores de crescimento e fatores angiogênicos) que auxiliam o reparo/regeneração de regiões injuriadas (Uccelli et al., 2008).

Tabela 1. Efeito biológico das MSCs em estudos pré-clínicos de diversas doenças.*Adaptada de Ucceli et al., 2008*

| <i>Doença</i> | <i>Modelo animal</i> | <i>Órgão alvo</i> | <i>Mecanismos ação MSCs</i> | <i>Rota administração</i> |
|------------------------|----------------------|------------------------------|---|----------------------------|
| Co-infusão MSC e HSC | Ovelha | Hematopoéticos | Aumento da hematopoese | Sistêmica |
| Infarto miocárdio | Camundongo | Coração | Desenvolvimento novos miócitos e estruturas vasculares | Local |
| Rejeição enxerto pele | Macaco | Pele | Inibição linfócitos T | Sistêmica |
| Derrame | Rato | SNC | Liberação de fatores tróficos e indução de neurogênese | Sistêmica |
| Falência renal aguda | Rato | Rins | Inibição citocinas pró-inflamatórias e liberação fatores tróficos e antiapoptóticos | Sistêmica |
| EAE | Camundongo | SNC | Inibição linfócitos mielina-específicos e indução tolerância periférica | Sistêmica |
| Diabetes | Camundongo | Pâncreas e glomérulos renais | Indução céls progenitoras locais e inibição de infiltrado de macrófagos | Sistêmica |
| Artrite reumatóide | Camundongo | Articulações | Inibição céls T e geração céls Tregs | Sistêmica |
| Degeneração retina | Rato | Olho | Produção de fatores tróficos e antiapoptóticos | Local |
| Injúria pulmonar aguda | Camundongo | Pulmão | Inibição citocinas pró-inflamatórias | Sistêmica |
| Falência hepática | Rato | Fígado | Inibição da invasão leucocitária via liberação citocinas | Meio condicionado por MSCs |

1.4.2. Transplante de MSCs no diabetes experimental

Muitos estudos têm mostrado que o transplante de MSCs melhora o perfil metabólico de diversos modelos animais de diabetes (Tabela 2). Entretanto, os mecanismos responsáveis por tais melhoras ainda estão sendo esclarecidos, e muitos resultados controversos ainda são apresentados na literatura.

Em 2006, Lee e colaboradores mostraram que células estromais multipotentes humanas (hMSCs) migram e promovem reparo tecidual do pâncreas e glomérulos renais em camundongos NOD/scid diabéticos. Após o tratamento, a glicose sanguínea dos camundongos diabéticos normalizou, a concentração de insulina no soro aumentou em relação aos animais não-tratados, mas não foi detectada insulina humana na circulação (Lee et al., 2006). Urbán e colaboradores (2008) mostraram que MSCs cooperam com células da medula óssea (BMCs) no tratamento do DM-1. Após uma única injeção contendo 10^6 BMCs + 10^5 MSCs, a glicose sanguínea e a concentração de insulina no soro voltaram a níveis normais, acompanhados por uma eficiente regeneração do tecido pancreático. Além disso, o transplante de MSCs causou uma supressão da proliferação dos linfócitos T específicos para antígenos de células β pancreáticas, possibilitando que as ilhotas recém formadas pudessem sobreviver e produzir níveis normais de insulina (Urbán et al., 2008). Outro trabalho recente, Ezquer e colaboradores (2008) mostraram que a administração sistêmica de MSCs reverteu a hiperglicemia e preveniu nefropatia em camundongos com DM-1. Neste estudo, após uma única infusão de MSCs (0.5×10^6 céls) a glicemia e a glicosúria mantiveram-se normais por no mínimo dois meses e um aumento das ilhotas pancreáticas foi observado (Ezquer et al., 2008). Em 2008, Zhao e colaboradores mostraram que a expressão de TGF- β por células estromais derivadas de medula óssea de camundongos ICR foram capazes de reverter o diabetes em camundongos NODs através da modulação das subpopulações de células T CD4. Os pesquisadores demonstraram que as MSCs foram capazes aumentar a frequência de células T reguladoras e diminuir a frequência das células Th17. (Zhao et al., 2008). Boumaza et al. (2009) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com MSCs autólogas derivadas de medula óssea, levou ao aumento da expressão de insulina e PDX-1 (*Pancreas Duodenum Homeobox-1*, gene essencial para o desenvolvimento do pâncreas e produção de insulina) nas ilhotas pancreáticas, comparado aos animais controles. Além disso, em amostras de sangue periférico dos animais tratados com MSCs observou-se aumento da frequência de células T reguladoras quando comparado com grupo controle (Boumaza et al., 2009). Outro estudo que mostra a capacidade de imunomodulação das MSCs no DM-1 foi publicado em 2009 por

Madec e colaboradores. Neste estudo, uma única dose de MSCs derivadas de camundongos Balb/c (10^5 células) foi capaz de reduzir a capacidade de células T diabetogênicas se infiltrarem nas ilhotas pancreáticas de camundongos NODs, as MSCs migraram para os linfonodos pancreáticos e promoverem a indução de células T reguladoras Foxp3⁺ produtoras de IL-10 (Madec et al., 2009). Fiorina e colaboradores mostraram em 2009 o potencial terapêutico das células mesenquimais estromais derivadas de medula óssea murina em camundongos NODs. Foi demonstrado que, a utilização de MSCs alogênicas (derivadas de linhagens de camundongos não diabéticos- Balb/c) foi capaz de retardar o desenvolvimento da doença em camundongos NODs pré-diabéticos e de reverter temporariamente a hiperglicemia de 90% dos camundongos já diabéticos. Entretanto, quando utilizaram MSCs derivadas de camundongos NODs (autóloga), estas foram incapazes de produzirem o mesmo efeito das MSCs alogênicas. Além disso, as MSCs alogênicas apresentaram uma maior capacidade de migração para os linfonodos pancreáticos em relação às autólogas. Outro dado muito importante mostrado neste trabalho foi que cerca de 20% dos camundongos NODs tratados com MSCs autólogas apresentaram tumores em diferentes órgãos, o que pode estar correlacionado com a expressão aumentada de genes ligados a proliferação e ciclo celular nas MSCs derivadas de NODs em comparação com as MSCs de Balb/c (Fiorina et al., 2009).

Na grande maioria dos estudos utilizando MSCs no tratamento de doenças autoimunes, o efeito terapêutico das MSCs não parece estar associado com sua transdiferenciação nas células residentes que foram danificadas (células beta pancreáticas), mas sim parece estar mais relacionado com sua capacidade anti-proliferativa e anti-inflamatória, além da capacidade de estimular a sobrevivência e proliferação de células progenitoras residentes através da produção de citocinas e fatores de crescimento solúveis, ou seja, de seu efeito parácrino (Bernardo et al., 2009).

Tabela 2. Estudos utilizando MSCs como terapia para o diabetes experimental

| Autores | Modelo diabetes | Fonte MSCs | Dose e via de administração | Período da doença | Resultados |
|------------------------------|--|--------------------------------------|---|---|--|
| Lee et al. (2006) | 4 doses de STZ em camundongos machos Nod/Scid | Humana | 2 doses de 2×10^6 céls Ventriculo esquerdo | 6 e 11 dias após STZ | Reversão hiperglicemia, regeneração ilhotas e glomérulos renais |
| Urbán et al. (2008) | 5 doses de STZ camundongos fêmeas C57BL/6 | MSC+ BMC MSC:alógena ou singênica | 1 dose de 1×10^6 BMC + MSCs ($2,5 \times 10^4$, 5×10^4 ou 1×10^5 céls) Veia caudal | 15 dias após STZ | 1×10^6 BMC + 1×10^5 MSCs foram suficientes para reverterem a hiperglicemia BMC ou MSC sozinhas não funcionaram Inibição linfócitos T específicos |
| Ezquer et al. (2008) | 5 doses de STZ camundongos machos C57BL/6 | Singênica | 1 dose de $0,5 \times 10^6$ céls Veia caudal | 20 dias após STZ | Reversão da hiperglicemia, glicosúria, albuminúria. |
| Zhao et al. (2008) | Camundongos NODs | Alogênico | 1 dose 5×10^6 céls Veia caudal | 12 semanas de idade | Reversão hiperglicemia, diminuição proliferação céls T, aumento Treg, diminuição Th17 dependente de TGF- β |
| Boumaza et al. (2009) | 1 dose STZ (40-50 mg/kg, i.v) ratos fêmeas Lewis | Singênica | 2-3 doses 3×10^6 céls Intravenosa | 4 e 10 dias após STZ -2,4 e 10 dias após -2,1 e 7 dias após | Reversão da hiperglicemia, aumento da expressão de PDX-1 nas ilhotas, mudança para padrão Th2 resposta, aumento Tregs |
| Madec et al. (2009) | Camundongos NODs | Alogênica | 1 dose 1×10^5 céls Intraperitoneal ou intravenosa | 4 semanas de idade | MSCs migrou para LNs pancreáticos, indução células FOXP3 ⁺ produtoras de IL-10 |
| Fiorina et al. (2009) | Camundongos NODs | Singênica e alógena | 4 doses de 5×10^5 céls Intravenosa | Preventivo (10 semanas) Terapêutico (após hiperglicemia) | Retardo do início da doença, reversão hiperglicemia, inibição linfócitos T específicos, aumento de citocinas padrão Th2 |



2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Os dois objetivos principais do presente estudo foram:

- I) Avaliar a população de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 (células Th17 e Tc17) no modelo de diabetes experimental quimicamente induzido por múltiplas doses de estreptozotocina (STZ)

- II) Avaliar o potencial terapêutico de células estromais mesenquimais (MSCs) humanas no tratamento do diabetes experimental quimicamente induzido por múltiplas dose de estreptozotocina (STZ)

2.2. Objetivos específicos

1) Avaliar em diversos períodos de progressão da doença quimicamente induzida:

- A histopatologia das ilhotas pancreáticas;
- A densidade de massa de células beta e células alfa pancreáticas;
- A população das células T reguladoras presentes no baço (células T CD4⁺CD25⁺ positivas para CTLA-4, GITR, PD-1 e Foxp3);
- A população das células T reguladoras presentes nos linfonodos pancreáticos (células T CD4⁺CD25⁺ positivas para Foxp3);
- A população das células T produtoras de IL-17 no baço e linfonodos pancreáticos (células Th17 e Tc17);
- As citocinas possivelmente envolvidas na destruição das células beta pancreáticas.

2) Avaliar após infusão de células estromais mesenquimais (MSCs) humanas em camundongos diabéticos:

- A evolução das taxas glicêmicas;
- A histopatologia das ilhotas pancreáticas;
- A densidade de massa de células beta e células alfa pancreáticas.

3. Matérias e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Indução do diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina (STZ) em camundongos C57BL/6

O diabetes foi induzido em camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 6-8 semanas de idade, após administração intraperitoneal de 5 doses (40 mg/kg) diárias e consecutivas de STZ (Sigma, St. Louis, MO). A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,5), mantida em gelo e utilizada dentro de 15 minutos após preparo.

3.2. Monitoramento da glicemia

As taxas glicêmicas dos camundongos foram monitoradas periodicamente e os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glicemia estavam acima de 250 mg/dl, por mais de duas medições consecutivas. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal e a taxa de glicose foi avaliada através do glicosímetro Accu-Check GO (Roche), pela manhã, na ausência de jejum.

3.3. Análises histológicas do pâncreas

Camundongos foram sacrificados através de deslocamento cervical, sendo o pâncreas coletado e fixado em solução tamponada de formaldeído 10%, processado, incluído em parafina e cortado no micrótomo com espessura de 5 µm. Após montagem das lâminas, os cortes foram corados por hematoxilina e eosina ou pela coloração de Gomori's. As lâminas foram observadas sob microscópio óptico (Olympus) para análise morfológica das ilhotas e presença/ausência de infiltrado inflamatório (coloração hematoxilina e eosina) e avaliação da massa de células produtoras de insulina (coloração de Gomori's).

3.4. Reações de imunohistoquímica do pâncreas

Porções do pâncreas incluídas em parafina foram cortadas no micrótomo a 5 µm para realização das reações de imunohistoquímica. O material cortado, montado em lâminas de vidro, foi mantido em forno seco a 60 °C por 1 hora para adesão deste na lâmina. Em seguida, o material foi desparafinado e hidratado em uma bateria de xilol, álcool e água. A recuperação antigênica foi feita através da fervura dos cortes, em tampão citrato, pH 6,0, por 7 minutos no microondas. Após recuperação, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com

o reagente *Peroxidase-Blocking Reagent* (DAKO). Foi utilizado PBS+BSA 1% por 20 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas e em seguida o anticorpo primário purificado rabbit anti-mouse anti-insulina (diluição 1:100; Santa Cruz) ou anti-glucagon (diluição 1:100; AbCam) foi incubado por 1h. O kit Universal *LSAB™+ Kit/HRP* foi usado posteriormente como fonte do anticorpo secundário e estreptavidina. A reação foi revelada com DAB e contracorada com hematoxilina de Harris. As lâminas foram observadas sob microscópio óptico (Olympus) para avaliação da massa de células produtoras de insulina e glucagon.

3.5. Obtenção de esplenócitos de camundongos controles e tratados com STZ

Os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical, sendo os baços coletados e colocados em placas de Petri pequenas e estéreis contendo 3 ml de meio de cultura RPMI incompleto (ausência de soro fetal bovino) sobre gelo. Em seguida, o tecido foi divulsionado até obtenção de uma suspensão celular turva. Essa suspensão foi centrifugada a 1.500 rpm durante 10 min, a 4° C, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso em 4 ml de tampão de lise Tris 0,17M e NH₄Cl 0,16M por 4 minutos. Para inativar a lise das células, foi acrescentado 6 ml de RPMI completo (10% soro fetal bovino). As células foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 min, a 4° C e posteriormente a concentração celular foi ajustada para serem feitas as marcações extracelulares e intracelulares para análises por citometria de fluxo.

3.6. Obtenção de linfócitos dos linfonodos pancreáticos de camundongos controles e tratados com STZ

Após sacrifício dos animais, os linfonodos pancreáticos dos animais controles e diabéticos foram coletados e colocados em placas de cultura contendo 3 ml de RPMI completo (10% soro fetal bovino). Cada placa de cultura continha os linfonodos de dois animais do mesmo grupo experimental, na tentativa de obter um número de células maior para as análises. Esses linfonodos foram triturados até obtenção da suspensão celular. As células foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 min, a 4° C e posteriormente a concentração celular foi ajustada para serem feitas as marcações extracelulares e intracelulares para análises por citometria de fluxo.

3.7. Imunofenotipagem das populações celulares do baço e linfonodos pancreáticos de camundongos controles e tratados com STZ

Alíquotas de 100 µl de solução, contendo 1 x 10⁶ células, de esplenócitos ou células dos linfonodos pancreáticos, foram incubadas com 100 µl de soro normal de coelho a 5% por

40 minutos para minimizar a possibilidade de ligação inespecífica dos anticorpos. Após esse período, as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente (TA), no escuro, com 1µl de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos (FITC, PE, PERCP e APC), adquiridos da Becton-Dickinson (BD) ou Pharmingen. Foram feitas marcações duplas ou triplas para a análise das diversas subpopulações celulares do baço e linfonodos pancreáticos. Todas as incubações foram realizadas no escuro para evitar perda de fluorescência. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 200 µl de PBS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSsort (BD). Para marcação intracelular (FOXP3), após marcação com os anticorpos contra os antígenos de superfície, fixação (*FACS lysing solution*, BD) e lavagens, as células foram permeabilizadas por 10 minutos a TA com 500 µl de solução de permeabilização (*FACS permeabilizing solution*, BD) e então incubadas com o anticorpo monoclonal contra a proteína intracelular ou isotipo controle intracelular, por 30 minutos a TA. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS, e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo.

As seguintes subpopulações celulares presentes no baço foram analisadas: CD3⁺ (linfócitos T totais), CD3⁺CD4⁺ (linfócitos T *helper* ou auxiliares), CD3⁺CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos), CD11b⁺CD11c⁻ (macrófagos), CD11b⁺CD11c⁻/CD11b⁻CD11c⁺ (células dendríticas), CD4⁺CD25⁺GITR⁺, CD4⁺CD25⁺PD-1⁺, CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, (células T regulatórias), CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ (linfócitos T *helper* produtores de IL-17) e CD3⁺CD8⁺ IL-17⁺ (linfócitos T citotóxicos produtores de IL-17). Para as células dos linfonodos pancreáticos foram feitas as seguintes marcações: CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (células T reguladoras), CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ (linfócitos T *helper* produtores de IL-17) e CD3⁺CD8⁺ IL-17⁺ (linfócitos T citotóxicos produtores de IL-17). Não foram feitas outras marcações em virtude da baixa quantidade de células obtidas dos linfonodos pancreáticos.

Controles isotípicos (IgG₁-FITC, IgG_{2a}-PE, IgG₁-PercP e IgG_{2a}-APC) foram incluídos em todos os experimentos para determinação de marcação inespecífica. Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por parâmetros de granularidade (SSC). Foram adquiridos 100.000 eventos/amostra para as células do baço e 20.000 eventos/amostra para as células dos linfonodos pancreáticos. As análises foram realizadas utilizando-se o software *Cellquest* (BD). Os eventos da *gate* de linfócitos (R1) foram analisados para marcação com os

diferentes anticorpos por *dot plot* de fluorescência 1 (FL1), por fluorescência 2 (FL2). No caso de marcações triplas, foram feitos *dot plot* de FL1 por FL2, em seguida foi desenhada uma *gate* R2 na população duplo-positiva. A marcação de fluorescência 3 (FL3) na *gate* R2 foi representada por um histograma de FL3. Para as moléculas CTLA-4, GITR, PD-1, CCR5 e FOXP3 foram feitas análises das *gates* contendo as populações de linfócitos CD4⁺CD25^{total} e CD4⁺CD25^{hi} (Figura I- Anexo).

3.8. Detecção da produção de IL-17 por linfócitos T

A produção de IL-17 por linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) ou CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) foi detectada por citometria de fluxo, realizando-se marcação intracelular de IL-17 produzida pelos linfócitos em níveis basais ou após ativação com estímulos policlonais. Esplenócitos e células dos linfonodos pancreáticos foram isolados como descrito anteriormente, ressuspendidas em RPMI contendo 10% de soro bovino fetal, plaqueadas em placas de cultura de 6 wells, na concentração de 2×10^6 céls/ml. As células foram incubadas a 37° C e estimuladas com 25 ng/ml de PMA (forbol-miristato-acetato, Sigma) e 1 µg/ml de Ionomicina (Sigma). Após 1 hora de estimulação, foi adicionado monensina (Sigma) e a incubação foi mantida por mais 4 horas, totalizando um período de 5 horas de ativação célula. A monensina é uma inibidora do transporte intracelular de proteínas, onde a incubação de células na sua presença leva a um bloqueio do transporte de proteínas ao complexo de Golgi e um acúmulo dessas proteínas no retículo endoplasmático. Foram feitos dois tipos de amostras para os esplenócitos: 1, controle não-estimulado (células + monensina), usado para determinar o nível de produção basal de IL-17; 2, amostra estimulada (células + monensina + PMA + Ionomicina). Já para as células dos linfonodos pancreáticos, todas as células foram estimuladas, pois não havia células o suficiente para fazer os dois tipos de amostra (basal e ativada). Após as 5 horas, 1×10^6 células/amostra foram incubadas com 100 µl de soro normal de coelho a 5% por 40 min e posteriormente com anticorpos monoclonais (diretamente conjugados a fluorocromos) contra os antígenos de superfície (CD3/CD4 ou CD3/CD8) ou isotipos controles, por 20 minutos a TA. Todas as incubações foram realizadas no escuro para evitar perda de fluorescência. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas por 5 minutos a 1.500 rpm, ressuspendidas em 1 ml de solução de fixação e lise (*FACs lysing solution*, BD) e incubadas por 10 minutos a TA. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, ressuspendidas em 500 µl de solução de permeabilização (*FACS permeabilizing solution*, BD) e incubadas por 10 minutos a TA. Após

lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo anti-citocina IL-17 ou isotipo controle intracelular diretamente conjugados a fluorocromos por 30 minutos a TA. As células foram então lavadas novamente, ressuspensas em 200 µl de PBS e analisadas no citômetro de fluxo. Controles isotípicos (IgG₁-FITC, IgG_{2a}-PE, IgG₁-Percp e IgG_{2a}-APC) foram incluídos em todos os experimentos para determinação de marcação inespecífica.

Foram adquiridos 100.000 eventos/amostra para as células do baço e 20.000 eventos/amostra para as células dos linfonodos pancreáticos. As análises foram realizadas utilizando-se o software *Cellquest* (BD). Os eventos da *gate* de linfócitos (R1) foram analisados para marcação com os diferentes anticorpos por *dot plot* de fluorescência 1 (CD3), por fluorescência 2 (CD4/CD8). Em seguida foi desenhada uma *gate* R2 na população duplo-positiva. A marcação de fluorescência 3 (IL-17) na *gate* R2 foi representada por um histograma de FL3.

3.9. Dosagem de citocinas do homogenato pancreático

Após sacrifício dos animais, porções do pâncreas foram coletadas, pesadas e congeladas a -70 °C na presença de 700 µl de inibidor de proteases *Complete* (Roche). Cerca de 2 horas antes da dosagem das citocinas, o material foi descongelado e triturado com o auxílio do Politron (Brinkman) para obtenção do homogenato pancreático. Após homogeneização, o preparado foi centrifugado e o sobrenadante coletado para quantificação por ELISA das seguintes citocinas: IL-23, IL-17, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-10 (Kits R&D System).

3.10. Isolamento das células estromais mesenquimais (MSCs) de medula óssea humana

Cerca de 15 ml de medula óssea foram aspirados de indivíduos saudáveis através de punções de crista ilíaca posterior direita, após consentimento assinado. A separação das células mononucleares da medula óssea foi feita através da centrifugação em gradiente de densidade Ficoll HypaqueTM, e cerca de 1×10^7 células foram ressuspensas em meio de cultura α -MEM com 15% de soro bovino fetal (SBF), plaqueadas em garrafa de 75 cm² e cultivadas a 37°C com 5% de CO₂. Após 3-7 dias, as células não-aderentes foram removidas e adicionados 20 ml de meio de cultura. O meio de cultura foi trocado a cada 3-4 dias e quando as células estiveram semi-confluentes, estas foram tripsinizadas e repicadas (1^a passagem). Na terceira passagem, foram separadas amostras para: 1: caracterização imunofenotípica; 2:

caracterização do potencial de diferenciação das MSCs em adipócitos e osteócitos; 3: infusão nos camundongos C57BL/6 tratados com STZ.

3.11. Imunofenotipagem de MSCs humanas derivadas de medula óssea

Alíquotas de 100 µl de MSCs, na concentração de 1×10^6 células/ml foram incubadas por 20 minutos a TA, no escuro, com 5µl de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE)). Foram feitas marcações simples ou duplas para a análise dos diversos marcadores. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.500 rpm, lavadas duas vezes com PBS, ressuspendidas em 200 µl de PBS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSort (Becton-Dickson). Foram adquiridos 20.000 eventos/amostra com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). As análises foram realizadas utilizando-se o software *Cellquest* (BD). Para a caracterização imunofenotípica das MSCs humanas foram utilizados os anticorpos monoclonais contra os seguintes marcadores: CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD31, CD54, CD73, CD105, CD34, HLA-CLASSE I, HLA- CLASSE II, CD166, CD49e, CD146 e CD13.

3.12. Diferenciação das MSCs em adipócitos e osteócitos

Para avaliação do potencial de diferenciação *in vitro* das MSCs em adipócitos e osteócitos, 3×10^4 MSCs foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro colocadas no interior de poços da placa de 24 poços, contendo 1 mL de meio de cultivo cultura α -MEM com 15% SBF. Após 48 horas, o meio de cultivo foi substituído pelo meio indutor de diferenciação de adipócitos ou osteócitos. Células cultivadas em meio α -MEM com 15% SBF serviram como controles do experimento. Para diferenciação em adipócitos, o meio de cultura α -MEM com 15% SBF foi suplementado com 100 mM de dexametasona, 10 µg/mL de insulina, 100 µM de indometacina (pH 7,2). O meio indutor de osteogênese era composto de α -MEM com 7,5% SBF, 1 µM de dexametasona, 200 µM de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerolfosfato (pH 7,2). Durante a indução da diferenciação, os meios indutores foram renovados a cada três dias e as células foram mantidas em cultura por 21 dias. Após este período, a diferenciação das MSCs em adipócitos ou em osteócitos foi avaliada por meio das colorações de Sudan II-Escarlate e de Von Kossa, respectivamente. Para verificar a ocorrência de diferenciação adipocítica, as células aderidas às lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas em álcool 70% por 3 minutos

seguida da incubação com os corantes Sudan II-Escarlate e Hematoxilina de Harris. A diferenciação em osteócitos foi avaliada por meio da coloração de von Kossa. Resumidamente, as células aderidas às lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem com água destilada, as células foram incubadas em solução de nitrato de prata 5% no escuro durante 30 minutos e, após decorrido o tempo, as células foram lavadas com água destilada. Em seguida, as lamínulas contendo as células foram expostas à luz branca de uma lâmpada de 100W posicionada a 30 cm de distância das amostras por 45 minutos. Após este período, as células foram incubadas durante poucos segundos em solução de tiosulfato de sódio 5%, lavadas com água destilada e, por fim, coradas com Hematoxilina de Harris durante 2 minutos.

3.13. Infusão de MSCs em camundongos C5BL/6 tratados com STZ

Na terceira passagem, as MSCs humanas foram tripsinizadas, lavadas com RPMI completo + Pulmozyme (DNase-Roche) para evitar formação de grumos celulares e coletadas para infusão via intravenosa. O *pellet* celular foi ressuspendido em 200 µl de PBS+Pulmozyme e mantido em gelo até o momento do transplante. Foram transplantadas duas doses de $0,5 \times 10^6$ células e 1×10^6 células, com intervalo de uma semana entre as infusões, no plexo orbital dos camundongos C57BL/6 tratados com STZ, anestesiados com ketamina e xilasina intramuscular. Os transplantes foram realizados nos dias 21 e 28 após administração da última dose STZ. Os grupos controles receberam as múltiplas doses de STZ e no momento dos transplantes receberam apenas injeções contendo PBS+Pulmozyme.

3.14. Teste de Tolerância à Glicose

Após 8h de jejum foi realizado o teste de tolerância a glicose nos animais diabéticos que receberam ou não as infusões de MSCs, bem como animais saudáveis (WT-selvagens). A solução de glicose foi administrada na cavidade peritoneal na concentração de 1,5 mg por grama de animal e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração desta. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal nos determinados períodos de tempo e a taxa de glicose foi avaliada através do glicosímetro Accu-Check GO (Roche).

3.15. Coleta e congelamento do pâncreas

Camundongos tratados ou não com MSCs e camundongos WT foram sacrificados através de deslocamento cervical e amostras de pâncreas foram coletadas e congeladas em Tissue Tek® OCT (Sakura) e mantidas a -70°C para realização das reações de imunofluorescência.

3.16. Reações de imunofluorescência do pâncreas

Porções do pâncreas, congelados em Tissue Tek® OCT, foram cortadas na espessura de 8 µm no criostato e os cortes fixados em acetona gelada por 10 minutos. Após fixação, as lâminas foram mantidas por 1 hora em solução de glicina 0,1M para remoção dos grupamentos aldeídos e em seguida em PBS+BSA 2%+Triton100x 0,1% por 30 min para permeabilização da amostra. O anticorpo primário (anti-insulina ou anti-glucagon – diluição 1:100; Santa Cruz Biotechnology) foi incubado por 2 horas, lavado e o anticorpo secundário conjugado com Alexa 594 (diluição 1:200; Invitrogen) foi adicionado por mais 1 hora. Após lavagem, foi acrescentado o DAPI (Abbot Molecular) por 5 minutos e em seguida as lâminas montadas com Fluormount (Sakura). As lâminas foram analisadas através de microscópio de fluorescência (Zeiss Axioscop 2 Plus) para detecção das células positivas para os hormônios acima mencionados.

3.17. Quantificação da região marcada por imunofluorescência

O total de área marcada (positiva) para insulina nas ilhotas pancreáticas foi quantificada através do *software ImageJ*.

3.18. Análise dos dados

Foi utilizado o *t-test* para avaliar as diferenças existentes entre dois grupos experimentais (tratados com STZ x controles, ou tratados com MSC x não tratados). Para comparação de mais de dois grupos, utilizamos o teste ANOVA e como pós-teste Tukey's. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o *valor p* foi menor que 5% ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos e a confecção dos gráficos foram realizados pelo programa estatístico *GraphPad*.



4. Resultados

Parte I

4. Resultados

4.1. Caracterização das populações de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 no modelo de diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina (STZ).

4.1.1. Padronização do modelo de diabetes quimicamente induzido por STZ: Evolução da hiperglicemia e peso corpóreo

O diabetes foi induzido em camundongos machos (25g, n=5), da linhagem C57BL/6, após administração intraperitoneal de 5 doses diárias e consecutivas de STZ (40 mg/kg) dissolvida em tampão citrato de sódio. Os animais controles (25g, n=5) receberam apenas injeções de tampão citrato de sódio. As taxas glicêmicas e o peso dos camundongos foram monitorados periodicamente e os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glicemia estavam acima de 250 mg/dl, por mais de duas medições consecutivas. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal e a taxa de glicose foi avaliada pela manhã (não jejum) utilizando-se um glicosímetro *Accu-Check Go* (Roche).

Antes do início do tratamento com STZ, os animais apresentavam média de glicemia de $132,5 \pm 12,39$ mg/dl. No 10º dia após o início da administração de STZ a taxa glicêmica aumentou, chegando a atingir níveis considerados hiperglicêmicos ($301 \pm 105,34$ mg/dl). A partir desse período, o grupo injetado com STZ se manteve diabético e hiperglicêmico, sendo este fato comprovado por altos níveis de glicose no sangue até o 110º dia de observação, no qual foi o período máximo de observação. Por outro lado, os animais controles mantiveram níveis normais de glicemia, com média de $114,52 \pm 2,50$ mg/dl ao longo de todo período observado (Figura 2). Os valores das glicemias mensuradas nos diversos períodos de tempo analisados estão resumidos na Tabela 3.

Com relação ao massa corpórea, foi possível observar que os animais tratados com STZ mantiveram a mesma massa corporal em todo período analisado, enquanto que os animais controles adquiriram peso ao longo do experimento. No grupo de animais tratados com STZ, a média do peso antes da administração de STZ foi de $25,2 \pm 0,14$ g e após 110 dias pós-tratamento com STZ essa média foi de $24,4 \pm 2,00$ g ($p > 0,05$). Por outro lado, os animais do grupo controle ganharam peso com o passar dos dias, sendo que a média do peso no início do experimento foi de $25,2 \pm 0,10$ g e no final foi para $31,0 \pm 1,01$ g ($p < 0,05$)

Os valores dos pesos mensurados nos diversos períodos de tempo analisados estão resumidos na Tabela 4.

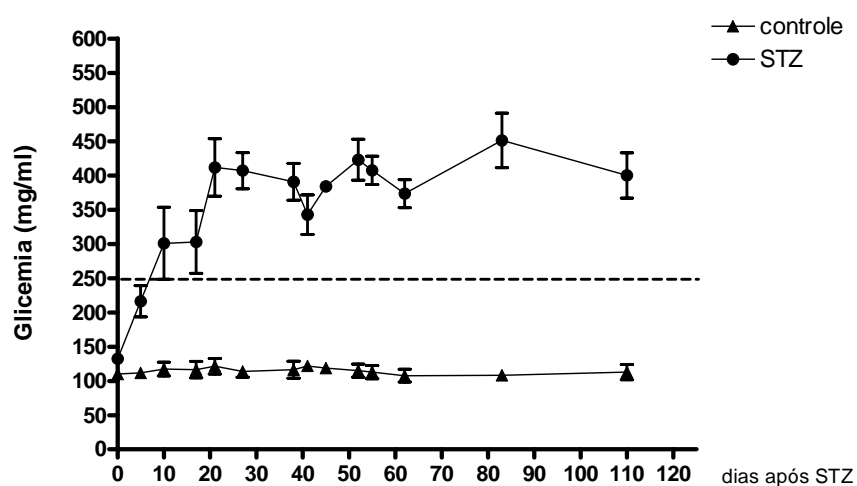


Figura 2. Evolução da hiperglicemia dos camundongos tratados com múltiplas doses de STZ. Os animais tratados com estreptozotocina (STZ, n=5) receberam cinco doses diárias e consecutivas de STZ (40 mg/kg) diluídas em tampão citrato de sódio (via i.p) e os animais controles (n=5) receberam somente injeções contendo tampão citrato de sódio somente. As glicemias foram monitoradas periodicamente pela manhã, na ausência de jejum. Os camundongos tratados com STZ desenvolveram hiperglicemia que se manteve durante todo período analisado. Os animais controles apresentaram valores normais de glicemia durante todo estudo. Cada ponto no gráfico corresponde à média dos valores mensurados em um determinado período de tempo, com o respectivo desvio padrão.

Tabela 3. Valores das taxas glicêmicas (mg/dl) dos animais controles e dos animais tratados com múltiplas doses de STZ.

| <i>Dias após administração</i> | <i>Controle (n=5) (mg/dl)</i> | <i>STZ (n=5) (mg/dl)</i> |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| 0 | 110,00 ± 10,53 | 132,5 ± 12,39 |
| 5 | 111,66 ± 11,50 | 216,5 ± 45,71 |
| 10 | 117,33 ± 17,47 | 301,0 ± 105,34 |
| 17 | 116,33 ± 20,98 | 303,0 ± 79,50 |
| 21 | 121,33 ± 19,85 | 411,7 ± 84,18 |
| 27 | 113,60 ± 14,01 | 407,0 ± 52,52 |
| 38 | 116,00 ± 21,50 | 390,0 ± 53,91 |
| 41 | 122,00 ± 10,53 | 342,6 ± 50,14 |
| 45 | 118,66 ± 13,42 | 384,0 ± 13,07 |
| 52 | 115,00 ± 16,82 | 423,0 ± 59,75 |
| 55 | 112,66 ± 16,86 | 407,2 ± 41,29 |
| 62 | 107,66 ± 15,94 | 373,5 ± 28,99 |
| 83 | 108,29 ± 12,74 | 451,3 ± 68,96 |
| 110 | 112,60 ± 19,34 | 400,0 ± 66,40 |

Os animais tratados com estreptozotocina (STZ, n=5) receberam cinco doses diárias e consecutivas de STZ (40 mg/kg) diluídas em tampão citrato de sódio (via i.p) e os animais controles (n=5) receberam somente injeções contendo tampão citrato de sódio somente. As glicemias foram monitoradas periodicamente pela manhã, na ausência de jejum. Os valores estão representados pela média ± desvio padrão.

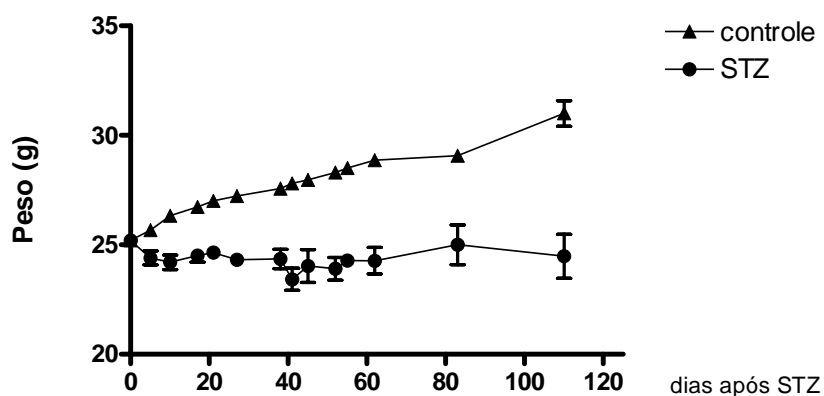


Figura 3. Evolução da massa corporal dos camundongos controles e tratados com múltiplas doses de STZ.

Os animais tratados com estreptozotocina (STZ, n=5) receberam cinco doses diárias e consecutivas de STZ (40 mg/kg) diluídas em tampão citrato de sódio (via i.p) e os animais controles (n=5) receberam somente injeções contendo tampão citrato de sódio somente. Os pesos foram monitorados periodicamente. Os camundongos tratados com STZ mantiveram o mesmo peso corporal durante todo período analisado, enquanto que os animais controles ganharam peso com o passar do tempo. Cada ponto no gráfico corresponde à média dos valores mensurados em um determinado período de tempo, com o respectivo desvio padrão.

Tabela 4. Valores da massa corporal (g) dos animais controles e dos animais tratados com múltiplas doses de STZ.

| <i>Dias após STZ</i> | <i>Controle (n=5)</i> (g) | <i>STZ (n=5)</i> (g) |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|
| 0 | 25,2 ± 0,10 | 25,2 ± 0,14 |
| 5 | 25,6 ± 0,15 | 24,4 ± 0,64 |
| 10 | 26,3 ± 0,21 | 24,2 ± 0,66 |
| 17 | 26,7 ± 0,12 | 24,5 ± 0,58 |
| 21 | 27,0 ± 0,10 | 24,6 ± 0,42 |
| 27 | 27,2 ± 0,15 | 24,3 ± 0,50 |
| 38 | 27,5 ± 0,06 | 24,3 ± 0,88 |
| 41 | 27,8 ± 0,10 | 23,4 ± 1,01 |
| 45 | 27,9 ± 0,15 | 24,0 ± 1,03 |
| 52 | 28,3 ± 0,26 | 23,9 ± 1,02 |
| 55 | 28,5 ± 0,36 | 24,2 ± 0,41 |
| 62 | 28,8 ± 0,15 | 24,2 ± 1,20 |
| 83 | 29,0 ± 0,12 | 25,0 ± 1,80 |
| 110 | 31,0 ± 1,01 | 24,4 ± 2,00 |

Os animais tratados com estreptozotocina (STZ, n=5) receberam cinco doses diárias e consecutivas de STZ (40 mg/kg) diluídas em tampão citrato de sódio (via i.p) e os animais controles (n=5) receberam somente injeções contendo tampão citrato de sódio somente. Os valores estão representados pela média ± desvio padrão.

4.1.2. Comparação entre animais tratados e não tratados com STZ, em relação às análises histopatológicas e possíveis mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão do diabetes experimental.

Após a indução do diabetes por STZ, os animais foram sacrificados em diferentes períodos da doença para serem analisados alguns parâmetros tais como: morfologia do pâncreas, preservação ou presença de infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas, avaliação da massa de células produtoras de insulina e glucagon, imunofenotipagem das populações celulares e linfocitárias do baço e linfonodos pancreáticos e dosagem de citocinas do homogenato pancreático.

Os animais foram sacrificados 6, 11, 18, 25 dias após o tratamento com STZ para avaliação dos parâmetros descritos acima, sendo esses comparados ao grupo controle (tratamento com tampão citrato). Em cada período estudado, utilizamos quatro animais controles (n=4) e seis animais tratados com STZ (n=6), a fim de minimizar as possíveis interferências metodológicas nos diferentes dias de experimento.

As análises histopatológicas foram feitas a partir de cortes histológicos do pâncreas que foram anteriormente fixados em formol 10%, processados e incluídos em parafina. Foi analisada a integridade das ilhotas pancreáticas, morfologia, e a presença/ausência de células infiltradas através da coloração por hematoxilina e eosina.

Avaliamos a massa de células beta produtoras de insulina através de duas metodologias distintas, coloração de Gomori's e reação de imunohistoquímica utilizando um anticorpo anti-insulina. A massa de células alfa produtoras de glucagon foi avaliada através da reação de imunohistoquímica utilizando um anticorpo anti-glucagon.

As populações celulares analisadas no baço dos animais tratados e não tratados com STZ foram: células T $CD3^+CD4^+$ (linfócitos T *helper* ou auxiliares), células $CD3^+CD8^+$ (linfócitos T citotóxicos), células $CD11b^+CD11c^-$ (macrófagos), células $CD11b^+CD11c^+/CD11b^-CD11c^+$ (células dendríticas). Foram analisadas também moléculas de propriedades regulatórias (CTLA-4, GITR, PD-1) expressas na superfície das células das populações de linfócitos T $CD4^+CD25^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}$. A população de células T reguladoras (Tregs) foi estudada com base na marcação intracelular do fator de transcrição Foxp3. Além disso, avaliamos a frequência de células produtoras de IL-17 ($CD3^+CD4^+ IL-17^+$ e $CD3^+CD8^+ IL-17^+$) no baço dos animais tratados ou não com STZ por meio de marcação da citocina intracelular. Nos linfonodos pancreáticos, em virtude da baixa quantidade de células

obtidas, estudamos apenas a população de células Tregs (Foxp3⁺) e as células produtoras de IL-17 (CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ e CD3⁺CD8⁺ IL-17⁺).

Realizamos também a quantificação de algumas citocinas (IL-23, IL-17, IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10) no homogenato pancreático através do ensaio de ELISA.

4.1.2.1 Análises do período de 6 dias após o tratamento com STZ

a) Animais

Seis dias após a indução do diabetes por STZ, o grupo que recebeu o tratamento com a droga (n=6) apresentou média de glicemia de $234,66 \pm 25,68$ mg/dl enquanto que a do grupo controle (n=4) foi de $123,25 \pm 11,08$ mg/dl.

b) Análises histológicas do pâncreas

Através da coloração de hematoxilina-eosina, as ilhotas pancreáticas do grupo controle mostraram-se com morfologia típica (arredondada), sem a presença de células infiltradas. Por outro lado, foi possível observar nos animais que receberam as doses de STZ a presença de infiltrado inflamatório ao redor das ilhotas (peri-insulite) e em alguns casos células infiltradas no interior das ilhotas (insulite), caracterizando assim o início do processo inflamatório e destruição das ilhotas pancreáticas decorrente da toxicidade da STZ (Figura 4).

Através da coloração de Gomori's, podemos notar que algumas células produtoras de insulina foram destruídas, uma vez que a intensidade da coloração das ilhotas dos animais tratados com STZ foi menor do que nos animais controles (Figura 5a,5b). Resultados semelhantes foram obtidos através da reação de imunohistoquímica utilizando um anticorpo anti-insulina, na qual os animais controles apresentaram extensa área marcada para insulina e nos animais tratados com STZ essa marcação foi visivelmente menor. (Figura 5c, 5d)

Realizamos também reações de imunohistoquímica para avaliar a massa de células produtoras de glucagon, e através da Figura 6 foi possível notar que essa população de células não foi alterada em virtude do tratamento com STZ. As células alfa mostraram-se distribuídas na região periférica da ilhota, em quantidades semelhantes (intensidade de marcação) em ambos os grupos estudados.

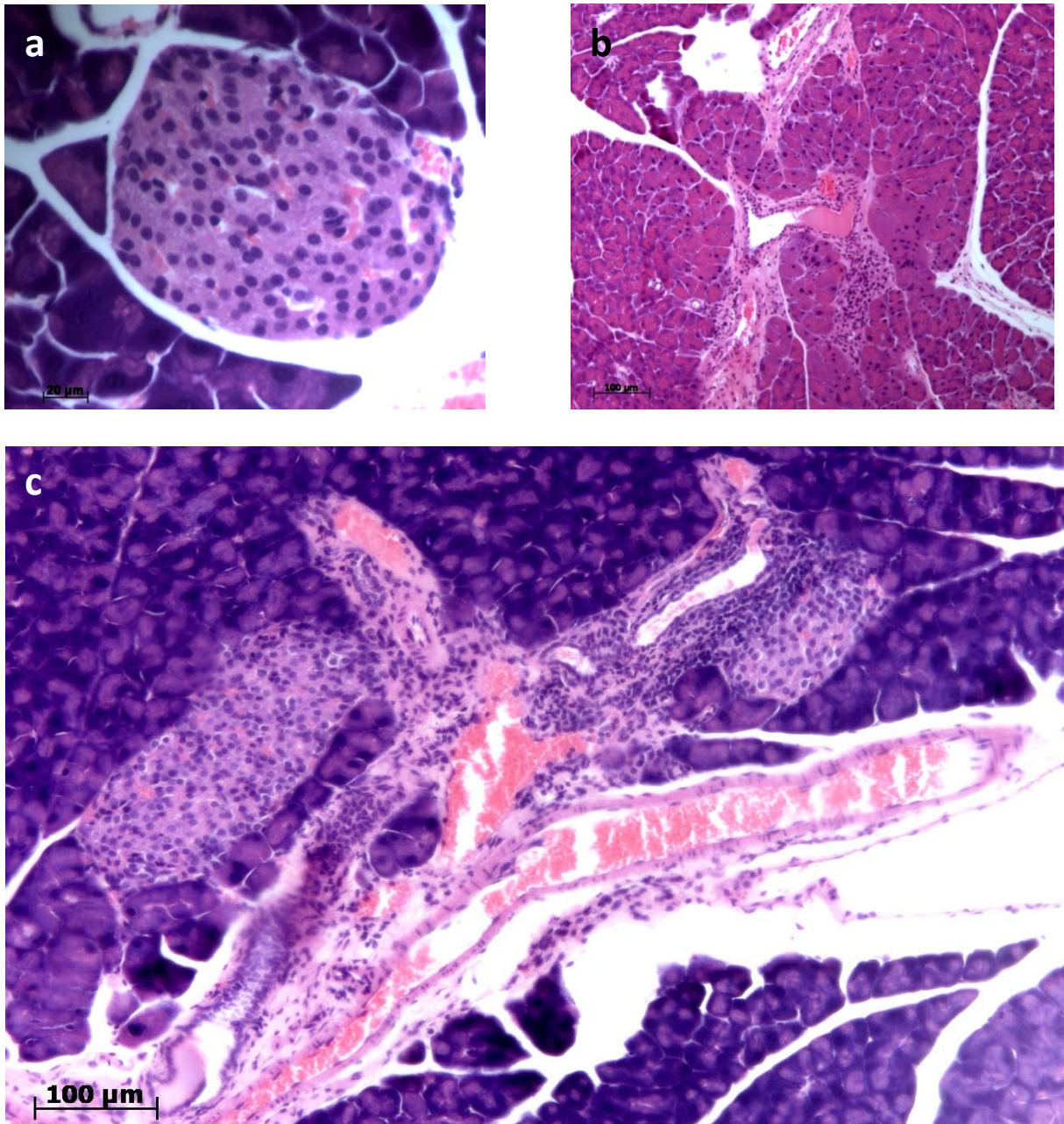


Figura 4. Análises histológicas do pâncreas de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5µm, corado com hematoxilina-eosina e visualizado em microscópio óptico. (a) Ilhota pancreática de camundongo controle, exibindo morfologia arredondada típica, ausente de células inflamatória infiltradas, aumento 400x. (b,c) Seis dias após a administração das múltiplas doses de STZ, o pâncreas dos animais exibiram início do processo inflamatório no interior (insulite) e ao redor das ilhotas pancreáticas (peri-insulite), aumento 100x.

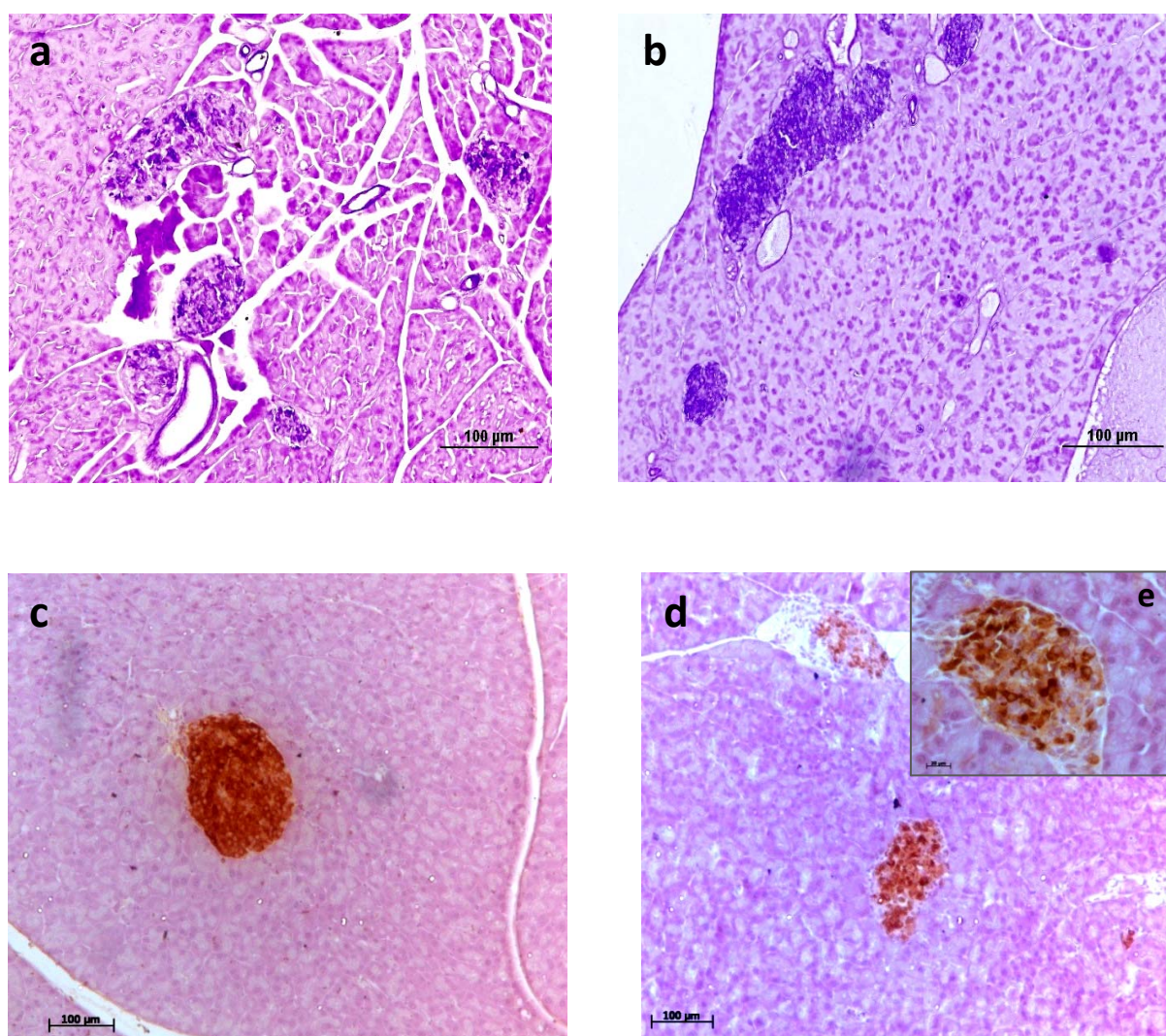


Figura 5. Análise da massa de células beta produtoras de insulina nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5µm, corado com a coloração de Gomori's (a,b) ou realizada reação de imunohistoquímica (streptavidina/peroxidase) para insulina (c,d,e). (a,c) Ilhotas pancreáticas de camundongos controles exibindo densa massa de células beta produtoras de insulina, evidenciada pela intensa coloração de Gomori's (a) e forte marcação para insulina (c). (b,d,e) Seis dias após a administração das cinco doses consecutivas de STZ, as ilhotas pancreáticas dos animais tratados apresentaram parcial destruição das células beta produtoras de insulina, uma vez que a coloração de Gomori's (b) e a intensidade da marcação para insulina (d,e) diminuíram em relação ao grupo controle.(a,b,c,d) aumento 100x; (e) aumento 400x.

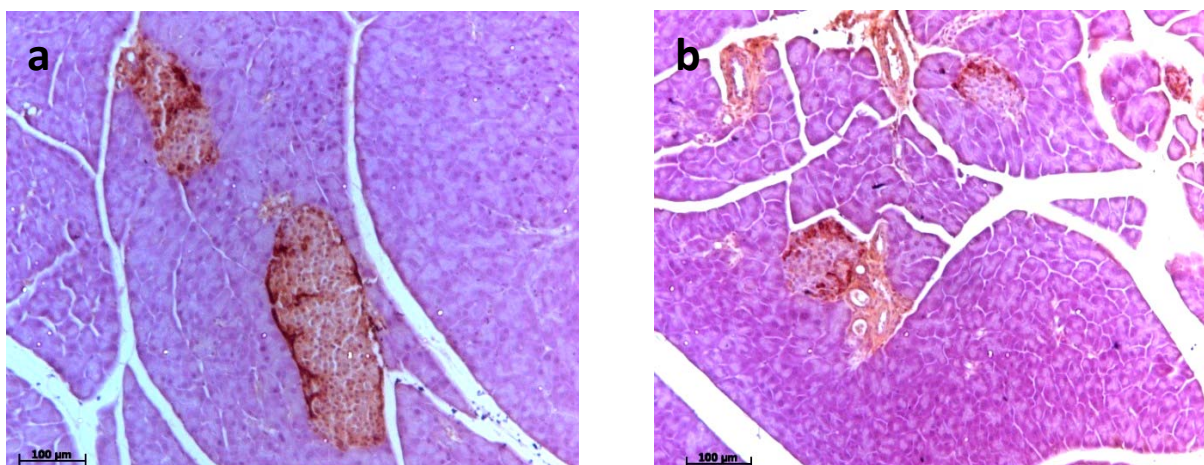


Figura 6. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5µm e posteriormente realizada reação de imunohistoquímica (streptavidina/peroxidase) para glucagon. (a) Ilhotas pancreáticas de camundongo controle exibindo a localização periférica da massa de células alfa produtoras de glucagon, aumento 100x. (b) Seis dias após a administração das múltiplas doses de STZ, as ilhotas pancreáticas dos animais tratados apresentaram o mesmo padrão de distribuição periférica e densidade de células alfa do grupo controle, aumento 100x.

c) Imunofenotipagem das populações celulares e linfocitárias do baço e linfonodos pancreáticos seis dias após indução do diabetes.

Seis dias após a última dose de STZ, o baço e linfonodos pancreáticos foram retirados dos animais controles (n=4) e dos animais diabéticos (n=6) para estudarmos as possíveis alterações sistêmicas (baço) ou locais (linfonodos pancreáticos) que ocorrem durante o desenvolvimento da doença quimicamente induzida. O número absoluto de células totais presentes no baço dos animais controles ($8,59 \pm 1,45 \times 10^7$ céls) e dos animais tratados com STZ ($8,21 \pm 1,30 \times 10^7$) foi semelhante ($p=0,680$). No entanto, o grupo que recebeu as múltiplas doses de STZ apresentou um maior número absoluto de células totais nos linfonodos pancreáticos em relação ao grupo controle ($6,92 \pm 0,24 \times 10^6$ céls grupo controle vs $8,98 \pm 0,17 \times 10^6$ céls grupo tratado com STZ, $p= 0,043$).

c.1) Análises das populações celulares do baço

Seis dias após o tratamento com STZ, as populações de linfócitos T *helper* ($CD3^+CD4^+$) e de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) mostraram-se aumentadas no baço dos animais que foram tratados com STZ em relação aos animais controles (Figura 7). A porcentagem de células T $CD3^+CD4^+$ presentes no baço dos animais controles foi de $18,07 \pm$

1,51% enquanto que nos animais tratados com STZ foi de $21,71 \pm 1,70$ ($p= 0,036$). Com relação às células T $CD3^+CD8^+$, estas estiveram presentes na frequência de $10,68 \pm 1,41\%$ no baço dos animais controles e aumentaram para $18,85 \pm 1,51\%$ nos animais tratados com STZ ($p=0,010$).

As populações celulares de macrófagos ($CD11b^+CD11c^-$) e de células dendríticas ($CD11b^+CD11c^+/CD11b^-CD11c^+$) estiveram em quantidades similares nos dois grupos de animais estudados. A frequência de macrófagos no baço dos animais controles foi de $3,27 \pm 1,41\%$ e, apesar do valor obtido ser maior nos animais que receberam a STZ, $6,13 \pm 1,92\%$, este aumento não foi estatisticamente significativo ($p=0,061$). O baço dos animais controles continham cerca de $5,20 \pm 1,04\%$ de células dendríticas e o nos animais tratados com STZ a porcentagem dessas células foi de $5,76 \pm 1,41\%$ ($p= 0,522$).

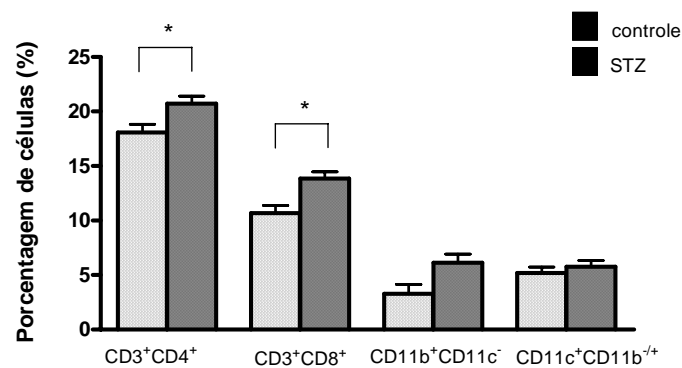


Figura 7. Análise das populações de células T $CD4^+$, T $CD8^+$, macrófagos e células dendríticas presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após indução do diabetes.

Seis dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. A população de linfócitos T helper foi avaliada com base na marcação dupla positiva para $CD3+CD4+$, os linfócitos T citotóxicos como $CD3+CD8+$, os macrófagos foram caracterizados com base na marcação $CD11b+CD11c^-$, e a população de células dendríticas foram identificadas através das marcações $CD11b+CD11c^+/CD11b^-CD11c^+$. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* $p<0,05$)

Estudamos também a expressão da molécula CD25 (cadeia α do receptor da citocina IL-2) na superfície dos linfócitos T *helper*. Os animais tratados com STZ apresentaram frequência de células T $CD4^+$ que expressavam a molécula CD25 na superfície ($CD4^+CD25^+$) semelhante ao grupo controle (Figura 8). No baço dos animais controles, a porcentagem de células T $CD4^+ CD25^+$ foi de $2,93 \pm 0,88\%$, enquanto que nos animais tratados com STZ foi de $3,38 \pm 0,25\%$ ($p=0,058$). A mesma relação pode ser vista na população de células T $CD4^+$

que exibiam alta expressão de CD25 na superfície ($CD4^+CD25^{hi}$), sendo que nos animais controles a frequência dessas células no baço foi de $0,32 \pm 0,21\%$ e nos animais tratados com STZ de $0,34 \pm 0,06\%$ ($p=0,803$).

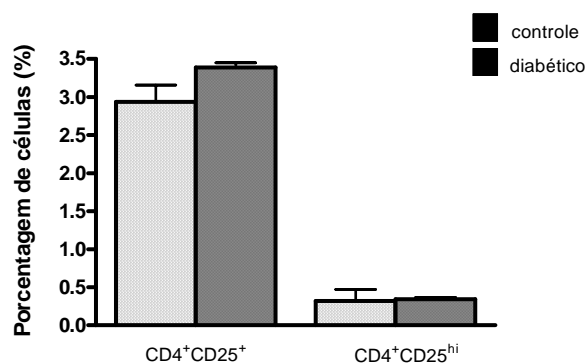


Figura 8. Análise das populações de células T $CD4^+CD25^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}$ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. Seis dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* $p<0,05$)

Foram analisadas também as células com perfil regulatório nos baços dos animais controles e tratados com STZ nesse dado período. As moléculas envolvidas na regulação da resposta imune analisadas foram: CTLA-4, GITR e PD-1. No grupo de animais tratados com STZ, a porcentagem das células T $CD4^+CD25^+$ que expressavam as moléculas CTLA-4 ($8,02 \pm 2,62\%$ vs $14,77 \pm 6,21\%$, $p=0,048$) e PD-1 ($12,21 \pm 3,65\%$ vs $18,49 \pm 3,43\%$, $p=0,043$) encontraram-se diminuídas em relação ao grupo controle (Figura 9a). Entretanto, a frequência das células T $CD4^+CD25^+$ que expressavam a molécula GITR foi semelhante nos grupos controles e tratados com STZ ($4,17 \pm 0,43\%$ vs $3,72 \pm 2,17\%$, respectivamente; $p=0,743$).

Comparamos também a intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, PD-1 e GITR na superfície das células T $CD4^+CD25^+$ nos dois grupos de animais. Foi possível observar menor expressão destas moléculas através da IMF nas células provenientes dos animais tratados com STZ em comparação com o grupo controle (Figura 9b), entretanto essa diferença só foi estatisticamente significativa para o GITR e PD-1 ($p<0,05$). Os valores das IMFs das moléculas estudadas estão resumidos na Tabela 5.

A expressão das mesmas moléculas foram analisadas para a população de células T $CD4^+$ que expressavam altos níveis de CD25 na sua superfície ($CD4^+CD25^{hi}$). Mais uma vez,

os animais tratados com STZ apresentaram porcentagem diminuída das células T CD4⁺CD25^{hi} que expressam moléculas CTLA-4 e PD-1 em comparação com os animais controles (Figura 9c). Nos animais controles, a porcentagem das células que expressam CTLA-4 na superfície foi de $11,45 \pm 4,09\%$ e nos animais tratados com STZ foi de $6,97 \pm 2,93\%$ ($p=0,023$). A molécula PD-1 estava presente na superfície de $18,48 \pm 3,43\%$ das células T CD4⁺CD25^{hi} do baço do grupo controle e em $12,21 \pm 3,65\%$ das células T CD4⁺CD25^{hi} dos animais tratados com STZ ($p= 0,004$). Novamente não observamos diferenças significativas na frequência das células positivas para a molécula GITR nos grupos controles e tratados com STZ ($12,58 \pm 6,81\%$ vs $7,87 \pm 3,32\%$, respectivamente; $p=0,105$). Com relação à intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas expressas na superfície das células T CD4⁺CD25^{hi}, todas as moléculas estiveram menos expressas na superfície das células dos animais tratados com STZ em comparação com os animais controles ($p<0,05$) (Figura 9d). Os valores das IMF estão listados na Tabela 6.

A população das células T reguladoras (Foxp3⁺) também foi analisada nos dois grupos experimentais e a expressão do fator de transcrição Foxp3 foi analisada tanto na população de células T CD4⁺CD25⁺ quanto nas células T CD4⁺CD25^{hi} (Figura 10a). Não foi possível observar diferenças na frequência de células T CD4⁺CD25⁺ positivas para o fator Foxp3 nos grupos de animais controles e tratados com STZ ($21,59 \pm 9,65\%$ e $22,69 \pm 5,60\%$, $p=0,854$; respectivamente). A mesma relação pode ser vista para a população de células CD4⁺CD25^{hi}, sendo que nos animais controles a porcentagem dessas células positivas para Foxp3 foi de $16,03 \pm 7,94\%$ e nos animais que receberam as doses de STZ de $12,11 \pm 4,21\%$ ($p=0,02$).

Com relação à IMF do fator de transcrição Foxp3, verificamos diminuição do nível de expressão nos animais tratados com STZ quando comparada com os animais controles, seja esse dado analisado na população de células T CD4⁺CD25⁺ quanto nas células T CD4⁺CD25^{hi} (Figura 10b). Na população de células T CD4⁺CD25⁺, o valor da IMF do Foxp3 no grupo controle foi de $52,62 \pm 25,04$ e nos animais tratados com STZ de $28,78 \pm 1,73$ ($p=0,043$). A IMF do Foxp3 analisada na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi} dos animais controles foi de $91,99 \pm 48,98$ enquanto que nos animais que receberam STZ reduziu para $33,34 \pm 4,51$ ($p=0,016$).

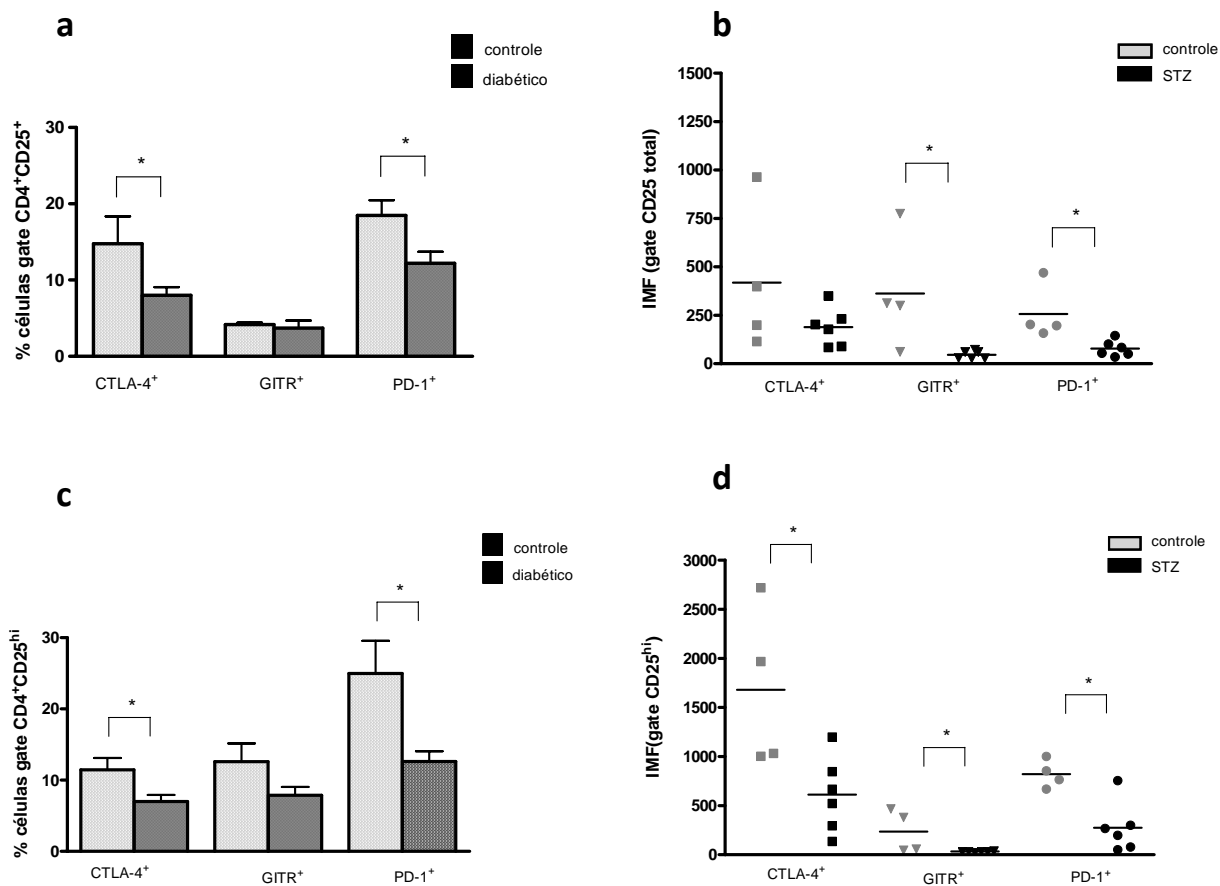


Figura 9. Análise da expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. Seis dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) Porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 e (b) IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, ambas avaliadas na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺. (c) Porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 e (d) IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, ambas avaliadas na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. Nos gráficos de dispersão, cada ponto representa o valor da IMF de um indivíduo e os traços horizontais representam a média dos valores. (* p<0,05)

Tabela 5. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes.

| <i>Molécula</i> | <i>Controle (n=4)</i> <i>IMF</i> | <i>STZ (n=6)</i> <i>IMF</i> | <i>valor p</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| CTLA-4 | 418,74 ± 383,38 | 188,83 ± 98,65 | 0,187 |
| GITR | 361,66 ± 298,59 | 45,88 ± 20,09 | 0,028* |
| PD-1 | 256,43 ± 143,21 | 134,72 ± 40,29 | 0,018* |

Os valores estão representados pela média da IMF com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

Tabela 6. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes.

| <i>Molécula</i> | <i>Controle (n=4)</i> <i>IMF</i> | <i>STZ (n=6)</i> <i>IMF</i> | <i>valor p</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| CTLA-4 | 1680,14 ± 824,32 | 610,55 ± 383,75 | 0,022* |
| GITR | 236,79 ± 217,21 | 32,43 ± 4,47 | 0,044* |
| PD-1 | 821,65 ± 140,59 | 274,39 ± 255,50 | 0,004* |

Os valores estão representados pela média da IMF com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

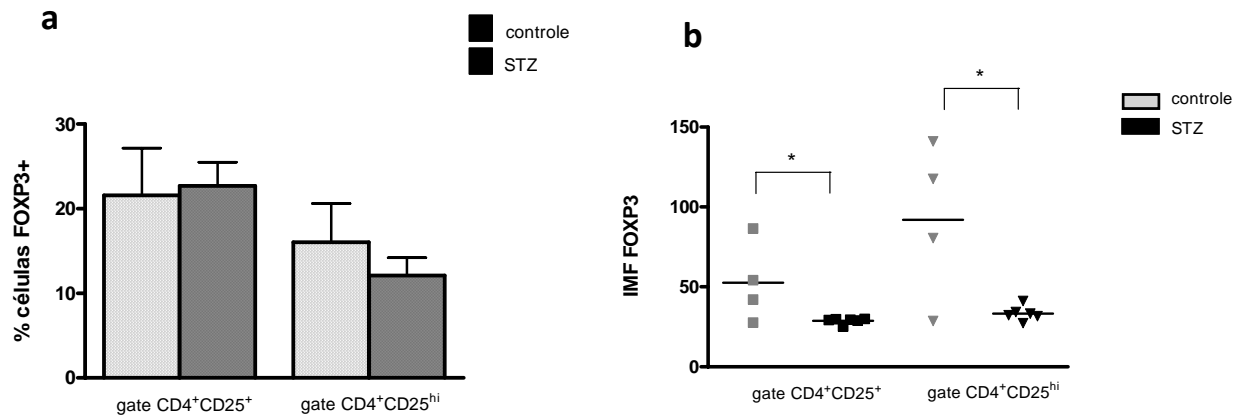


Figura 10. Análise da população de células T reguladoras Foxp3⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. Seis dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada tanto na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺ quanto na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. (b) IMF do fator Foxp3 expresso nas células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço dos animais controles e tratados com STZ. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. No gráfico de dispersão, cada ponto representa o valor da IMF das células de um indivíduo e os traços horizontais representam a média dos valores. (* p<0,05)

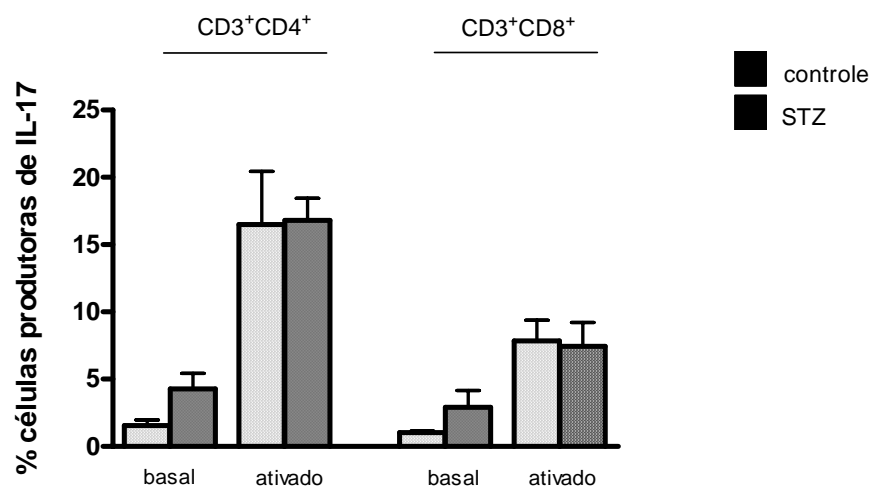


Figura 11. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-17 presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. Seis dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem, detecção de IL-17 intracelular e análise por FACS. A população de células produtoras de IL-17 foi avaliada em duas condições experimentais, sendo que na condição basal os esplenócitos foram cultivados na ausência de estímulos policlonais, e em condição de ativação eles foram cultivados por 5 horas na presença de PMA e ionomicina. A porcentagem de células produtoras de IL-17 foi avaliada tanto na *gate* de células CD3⁺CD4⁺ quanto na *gate* CD3⁺CD8⁺. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

As células Th17 (linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17) e Tc17 (linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-17) foram analisadas através do ensaio de citocina intracelular, no qual se avaliou a produção de IL-17 pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em condições de cultivo na ausência (estado basal) ou presença de estímulo policlonal (ativado com PMA e Ionomicina). Podemos observar através da Figura 11 que neste período não houve diferenças significativas na porcentagem desse subtipo celular no baço dos animais tratados com STZ e controles nas duas condições de cultivo (basal e ativado), tanto em relação às células CD4⁺ quanto CD8⁺. Em estado basal, a porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 no grupo controle foi de $1,55 \pm 0,84$ % e no grupo tratado com STZ de $4,28 \pm 2,78$ % ($p= 0,09$). Quando os esplenócitos foram ativados com estímulo policlonal, a porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 passou para $16,48 \pm 7,93$ % nos animais controles e para $16,79 \pm 4,03$ % nos animais tratados com STZ ($p= 0,936$). Com relação à população de células T CD8⁺ produtoras de IL-17, a porcentagem dessas células quando cultivadas sem estímulo foi de $1,03 \pm 0,22$ % nos animais controles e $2,90 \pm 3,07$ % nos animais tratados com STZ ($p=0,342$). Após cultivo com estímulos policlonais, a porcentagem dessas células foi de $7,84 \pm 2,68$ % nos controles e $7,45 \pm 4,69$ % nos animais tratado com STZ ($p= 0,892$), sendo, portanto, semelhante nos dois grupos analisados.

c.2) Análises das populações celulares dos linfonodos pancreáticos

A seguir, estudamos a frequência das células T CD4⁺CD25⁺ e das células T CD4⁺CD25^{hi} presentes nos linfonodos pancreáticos em ambos grupos experimentais. Não foi possível observar diferenças significativas na quantidade das células T CD4⁺CD25⁺ nos linfonodos dos animais controles ($2,76 \pm 1,59$ %) e tratados com STZ ($5,84 \pm 2,78$ %, $p= 0,263$). Por outro lado, a população de células T CD4⁺CD25^{hi} aumentou de maneira significativa nos linfonodos dos animais que receberam STZ ($1,95 \pm 0,36$ %) em comparação com os animais controles ($0,61 \pm 0,25$ %, $p= 0,001$) (Figura 12a).

Podemos observar que, em relação às células T reguladoras (Foxp3⁺), essas estiveram aumentadas nos linfonodos dos animais tratados com STZ em relação aos animais que não receberam a droga (Figura 12b). Ainda constatamos que, o grupo que recebeu as doses de STZ, apresentou maior frequência de células Foxp3⁺ dentro da população de células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} nos linfonodos pancreáticos em comparação com o grupo controle. Com relação à população de células T CD4⁺CD25⁺ presente nos linfonodos pancreáticos, cerca de $15,4 \pm 2,99$ % dessas células foram positivas para Foxp3 nos animais controles, e cerca de $50,15 \pm 8,66$ % das células T CD4⁺CD25⁺ dos animais tratados com STZ

foram positivas para esse fator de transcrição ($p=0,031$). No grupo controle, $18,16 \pm 4,63\%$ das células T $CD4^+CD25^{hi}$ presentes nos linfonodos pancreáticos foram positivas para FOXP3 e nos animais tratados com STZ essa frequência foi maior, passando para cerca de $48,8 \pm 11,95$ ($p=0,001$).

As populações de células Th17 e Tc17 também foram estudadas a fim de estabelecer uma possível relação desse tipo celular com o desenvolvimento do diabetes. Foi possível observar um aumento na frequência dessas células nos linfonodos pancreáticos dos animais tratados com STZ em relação aos animais controles (Figura 13). A porcentagem das células T $CD4^+$ produtoras de IL-17 nos animais tratados com STZ foi de $19,71 \pm 7,13\%$ e nos controles $8,31 \pm 4,23\%$ ($p= 0,001$). Em relação às células T $CD8^+$ produtoras de IL-17, a porcentagem nos animais que receberam STZ foi de $9,12 \pm 4,42\%$ e nos animais controles $4,04 \pm 2,48\%$ ($p= 0,017$).

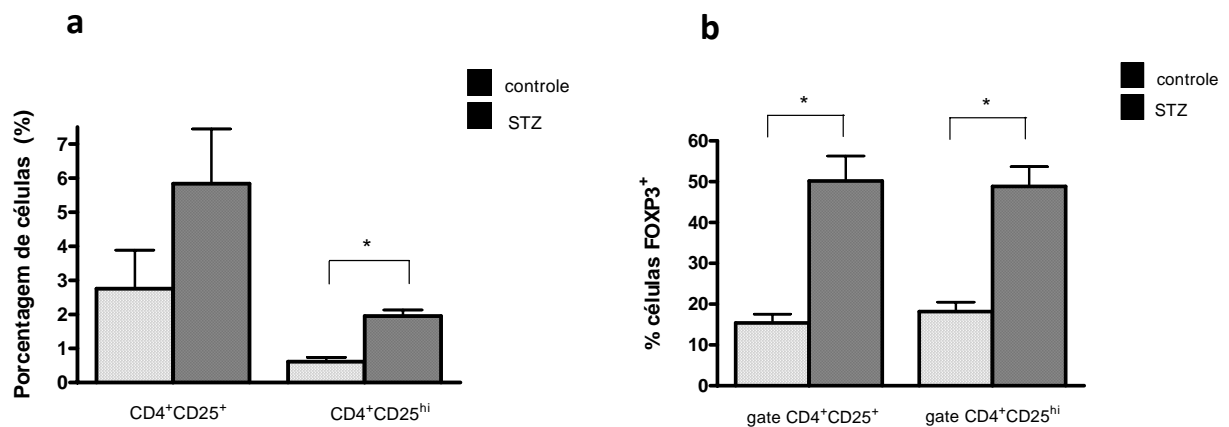


Figura 12. Análise da população de células T CD4⁺CD25⁺ e células T reguladoras Foxp3⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. Seis dias após tratamento com STZ/tampão citrato, os linfonodos pancreáticos dos animais foram coletados e as células isoladas para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) Porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{hi} presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com STZ. (b) A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada tanto na gate de células T CD4⁺CD25⁺, quanto na gate de células T CD4⁺CD25^{hi}. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

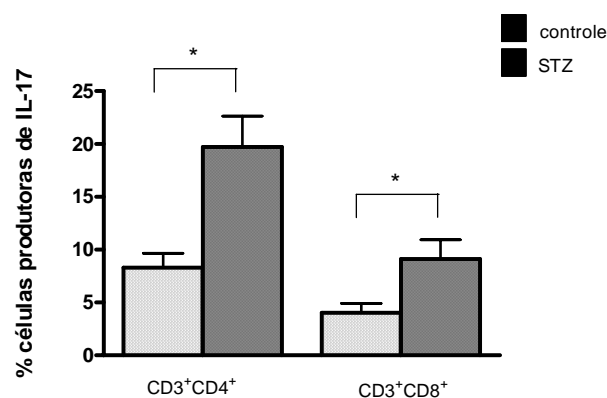


Figura 13. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-17⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. Seis dias após tratamento com STZ/tampão citrato, os linfonodos pancreáticos dos animais foram coletados e as células isoladas para imunofenotipagem, detecção de IL-17 intracelular e análise por FACS. A população de células produtoras de IL-17 foi avaliada após cultivo na presença de PMA e ionomicina por 5h (ativação). A porcentagem de células produtoras de IL-17 foi avaliada tanto na gate de células CD3⁺CD4⁺ quanto na gate CD3⁺CD8⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

d) Dosagem de citocinas presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com SZT seis dias após a indução do diabetes

Com a finalidade de investigar o mecanismo efetor relacionado à severidade de diabetes, quantificamos a produção das citocinas do padrão Th1 (IFN- γ e TNF- α), Th17 (IL-23, IL-17 e IL-6) e da citocina reguladora IL-10 no tecido pancreático. Podemos notar que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) na concentração das citocinas IL-23, IL-10, e IL-17 presentes no homogenato pancreático entre os dois grupos de animais (Figura 14). As concentrações dessas citocinas podem ser vistas na Tabela 7. Entretanto, verificamos diferenças significativas na concentração de IL-6, IFN- γ e TNF- α , uma vez que os animais tratados com STZ apresentaram níveis elevados dessas citocinas quando comparados com o grupo controle. A concentração de IL-6, IFN- γ e TNF- α no homogenato pancreático dos animais controles foi de $5,50 \pm 1,73$ ng/g de tecido; $7,54 \pm 3,13$ ng/g de tecido e $4,23 \pm 1,61$ ng/g de tecido, respectivamente. Já nos animais que receberam as múltiplas doses de STZ, essa concentração foi de $8,31 \pm 1,34$ ng/g de tecido ($p=0,018$), $11,51 \pm 2,50$ ng/g de tecido ($p=0,016$) e $7,17 \pm 1,42$ ng/g de tecido ($p=0,013$), respectivamente.

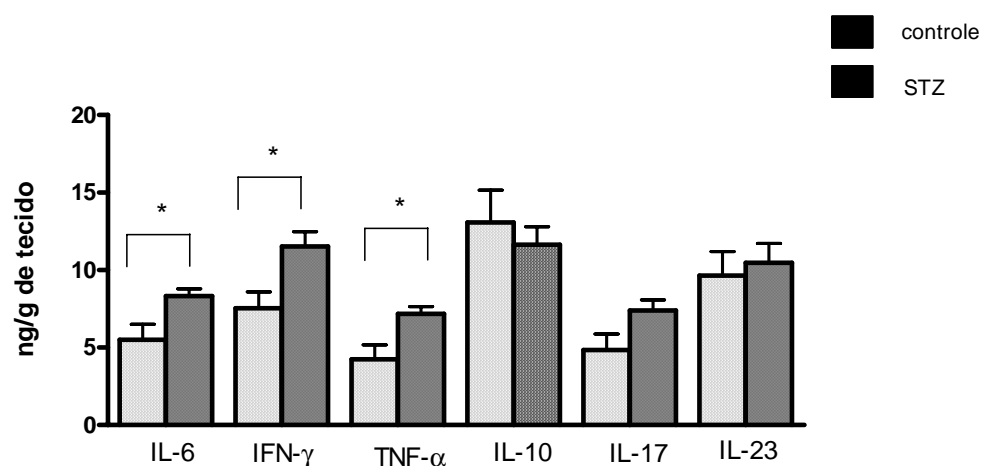


Figura 14. Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ seis dias após a indução do diabetes. Seis dias após tratamento com STZ/tampão citrato, porções do pâncreas foram coletadas, homogeneizadas na presença de inibidor de proteases e a partir do homogenato pancreático as citocinas foram quantificadas através do ensaio de ELISA. A concentração das citocinas está representada por nanograma de citocina por grama de tecido pancreático. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. (* $p < 0,05$)

Tabela 7. Concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático de camundongos controles e tratados com STZ, seis dias após indução do diabetes.

| citocina | controle (n=4) ng/g tecido | STZ (n=6) ng/g tecido | valor p |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|---------|
| IL-6 | 5,50 \pm 1,73 | 8,31 \pm 1,34 | 0,018* |
| INF- γ | 7,54 \pm 3,13 | 11,51 \pm 2,50 | 0,016* |
| TNF- α | 4,23 \pm 1,61 | 7,17 \pm 1,42 | 0,013* |
| IL-10 | 13,07 \pm 3,59 | 11,64 \pm 3,05 | 0,553 |
| IL-17 | 4,84 \pm 1,78 | 7,39 \pm 1,81 | 0,075 |
| IL-23 | 9,63 \pm 4,11 | 10,48 \pm 2,48 | 0,721 |

Valores representados como média \pm desvio padrão (* p<0,05)

4.1.2.2. Análises do período de 11 dias após o tratamento com STZ

a) Animais

Os animais tratados com STZ apresentaram média de glicemia de 374,83 \pm 77,37 mg/dl 11 dias após a administração da droga e os animais utilizados como controle exibiram média de glicemia de 118,3 \pm 1,04 mg/dl.

b) Análises histológicas do pâncreas

Através de cortes histológicos do pâncreas (coloração hematoxilina eosina), foi possível notar que o período de 11 dias após administração da STZ caracterizou-se por infiltrado celular acentuado no interior das ilhotas pancreáticas, refletindo desta forma, o processo de insulite e como conseqüente ataque e destruição mais severa das células beta produtoras de insulina (Figura 15)

A coloração de Gomori's e as análises feitas por imunohistoquímica para detecção das células produtoras de insulina confirmaram essa intensa destruição das células beta, uma vez que a coloração e a marcação para insulina diminuiu drasticamente quando comparada com o grupo controle. Desta forma, parece que o infiltrado inflamatório presente nas ilhotas visualizado através da coloração de hematoxilina e eosina, contribuiu de forma extensa e direta para a destruição da massa produtora de insulina (Figura 16). Com relação à massa de

células alfa produtoras de glucagon, não foi possível observar diferenças com relação à localização e quantidade destas células presentes nas ilhotas pancreáticas dos animais controles e tratados com STZ (Figura 17). Em ambos os grupos de animais, estas células se localizam na região periférica da ilhota e em quantidades muito semelhantes.

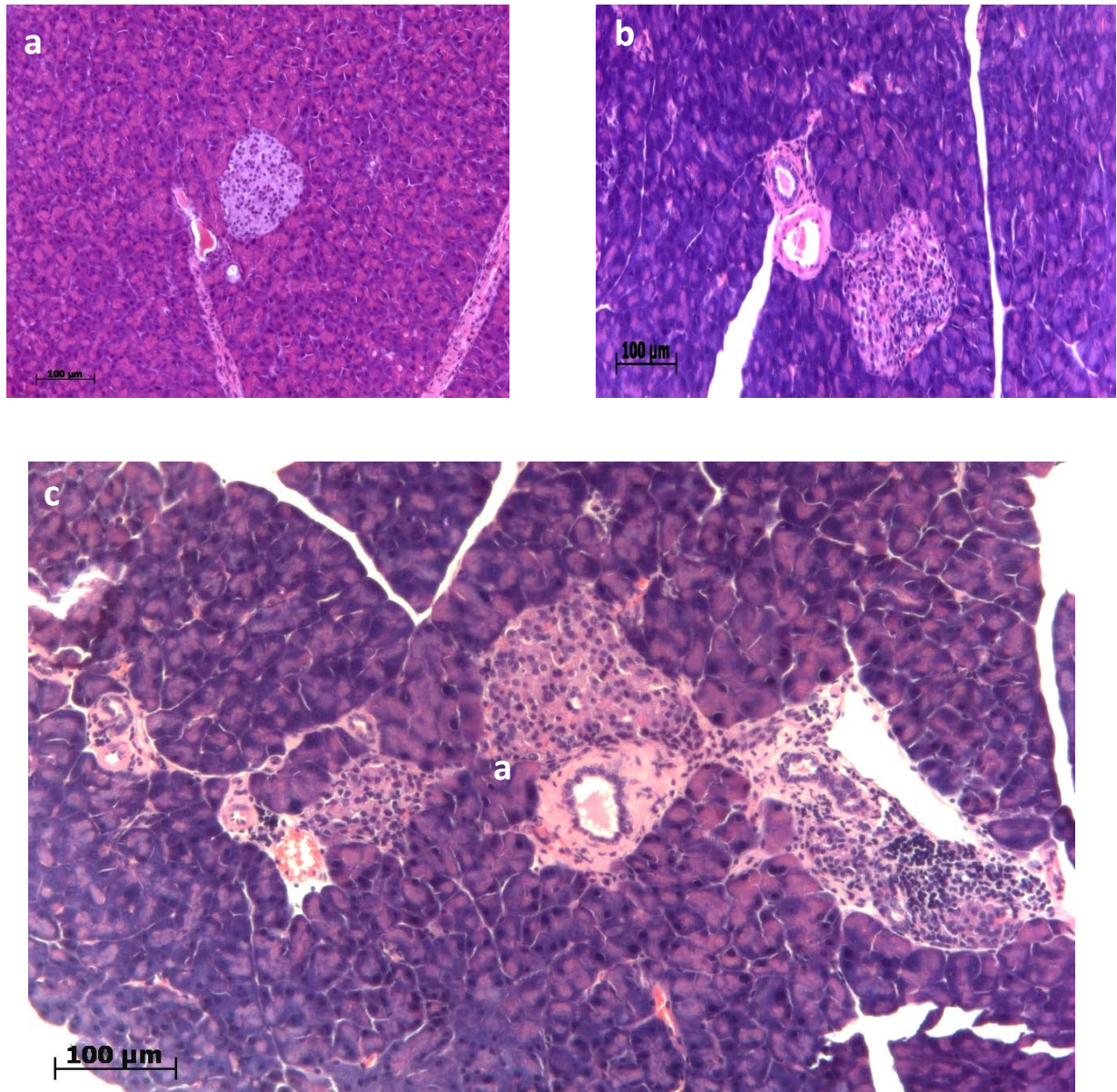


Figura 15. Análise histológica do pâncreas de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5µm, corado com hematoxilina-eosina e vizualizado em microscópio óptico. (a) Ilhota pancreática de camundongo controle, exibindo morfologia arredondada típica, ausente de células inflamatória infiltradas, aumento 100x. (b,c) Onze dias após a administração das múltiplas doses de STZ, o pâncreas dos animais exibiram intenso processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas (peri-insulite), aumento 100x.

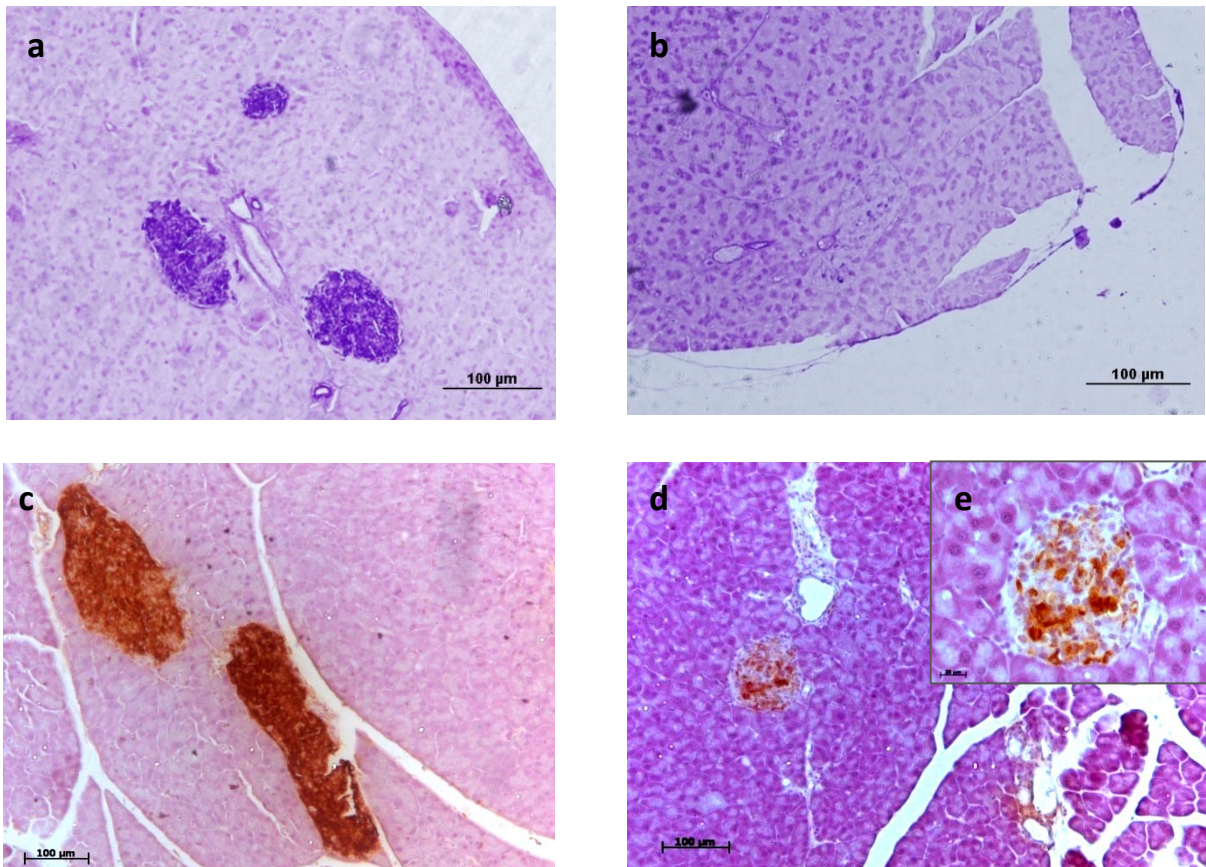


Figura 16. Análise da massa de células beta produtoras de insulina nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5 μ m, corado com a coloração de Gomori's (a,b) ou realizada reação de imunohistoquímica (streptavidina/peroxidase) para insulina (c,d). (a,c) Ilhotas pancreáticas de camundongos controles exibindo densa massa de células beta produtoras de insulina, evidenciada pela intensa coloração de Gomori's (a) e forte marcação para insulina (c), aumento 100x. (b,d,e) Onze dias após a administração das cinco doses consecutivas de STZ, as ilhotas pancreáticas dos animais tratados apresentaram substancial destruição das células beta produtoras de insulina, uma vez que a coloração de Gomori's (b) e a intensidade da marcação para insulina (d,e) diminuiram drasticamente em relação ao grupo controle. (b,d) aumento 100x, (e) aumento 40x.

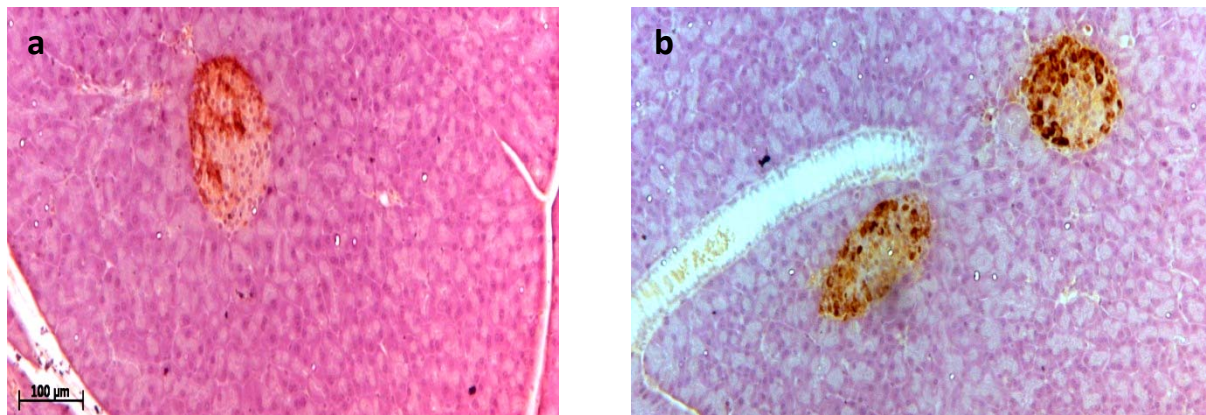


Figura 17. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5µm e posteriormente realizada reação de imunohistoquímica (streptavidina/peroxidase) para glucagon. (a) Ilhota pancreática de camundongo controle exibindo a localização periférica da massa de células alfa produtoras de glucagon, aumento 100x. (b) Onze dias após a administração das múltiplas doses de STZ, as ilhotas pancreáticas dos animais tratados apresentaram o mesmo padrão de distribuição periférica e densidade de células alfa do grupo controle, aumento 100x.

c) Imunofenotipagem das populações celulares e linfocitárias do baço e linfonodos pancreáticos onze dias após a indução do diabetes.

O número absoluto de células totais no baço dos animais controles e diabéticos foi semelhante, sendo que o baço dos animais controles apresentaram cerca de $7,86 \pm 1,42 \times 10^7$ células e no baço dos animais que receberam as doses de STZ esse número foi de $9,05 \pm 1,34 \times 10^7$ células ($p=0,261$). Com relação aos linfonodos pancreáticos, também não observamos diferenças no número absoluto de células totais no grupo de animais controles ($4,60 + 1,14 \times 10^6$ células) em comparação ao grupo de animais diabéticos ($5,47 + 0,78 \times 10^6$ células, $p=0,423$)

c.1) Análises das populações celulares do baço

Onze dias após o tratamento com STZ, os animais diabéticos apresentaram frequências de células T $CD4^+$, T $CD8^+$, macrófagos e células dendríticas semelhantes aos animais que não receberam as doses de STZ (Figura 18).

Com relação à população células T *helper* ($CD3^+ CD4^+$), a porcentagem dessas células no baço do grupo controle foi de $17,42 \pm 2,05\%$ e no grupo diabético de $17,76 \pm 2,08\%$, não apresentando, desta forma, diferenças significativas entre os dois grupos ($p= 0,804$). A população de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+ CD8^+$) também mostrou-se semelhante nos dois

grupos analisados, sendo que dentre as células do baço do grupo controle, $11,36 \pm 0,76\%$ eram células T $CD8^+$ e no grupo tratado com STZ essa frequência foi de $12,94 \pm 2,02\%$ ($p=0,187$). A população de macrófagos ($CD11b^+$) esteve em quantidades equivalentes no baço dos animais controles e nos diabéticos. A porcentagem de macrófagos no baço dos animais controles foi de $4,32 \pm 1,66\%$ e nos animais tratados com STZ de $3,81 \pm 0,66\%$ ($p=0,549$). As células dendríticas ($CD11c^+$) estiveram presentes no baço dos animais controles na frequência de $4,59 \pm 0,45\%$, enquanto que nos animais diabéticos a quantidade encontrada dessas células foi muito semelhante, ou seja, cerca de $5,37 \pm 1,49\%$ das células do baço desses animais foram células positivas para o marcador CD11c ($p=0,347$).

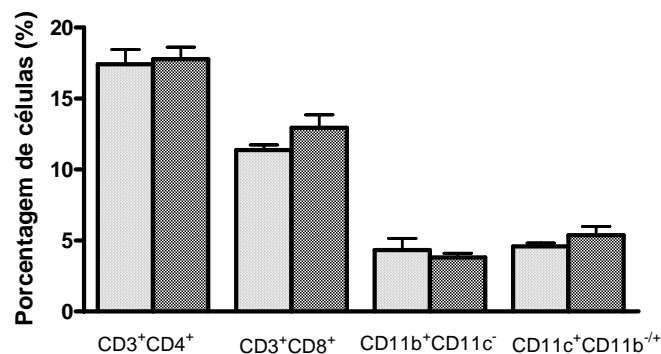


Figura 18. Análise das populações de células T $CD4^+$, T $CD8^+$, macrófagos e células dendríticas presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes.

Onze dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. A população de linfócitos T *helper* foi avaliada com base na marcação dupla positiva para $CD3^+CD4^+$, os linfócitos T citotóxicos como $CD3^+CD8^+$, os macrófagos foram caracterizados com base na marcação $CD11b^+CD11c^-$, e a população de células dendríticas foram identificadas através das marcações $CD11b^+CD11c^+/CD11b^-CD11c^+$. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* $p<0,05$)

Neste período de 11 dias após tratamento com STZ, a porcentagem de células $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^{hi}$ presentes no baço dos dois grupos de animais estudados foi semelhante (Figura 19). No grupo controle, a porcentagem de células $CD4^+CD25^+$ dentre as células do baço foi de $2,90 \pm 0,98\%$ e nos animais diabéticos de $3,39 \pm 0,49\%$ ($p=0,324$). Já as células que expressavam altos níveis de CD25 na superfície das células T $CD4^+$ ($CD4^+CD25^{hi}$) estiveram presentes em $0,19 \pm 0,06\%$ das células do baço dos animais controles e nos animais que receberam a STZ em $0,32 \pm 0,12\%$ ($p=0,095$).

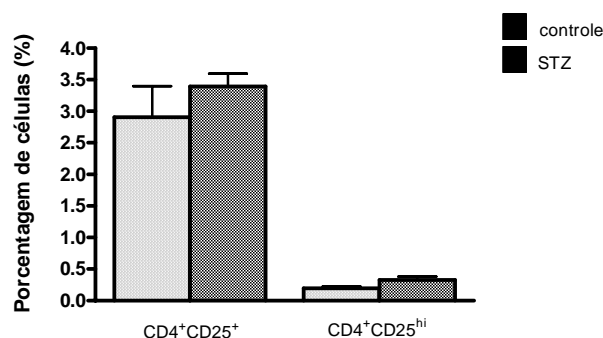


Figura 19. Análise das populações de células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. Onze dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

As moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 que regulam as resposta imunes também foram estudadas neste período. A porcentagem de células positivas para as moléculas CTLA-4 e PD-1, avaliadas dentro da população de células CD4⁺CD25⁺ foi menor nos animais diabéticos em comparação com os animais controles, no entanto, o mesmo não foi observado para a molécula GITR, que se mostrou em quantidades semelhantes nos dois grupos analisados (Figura 20a). Cerca de $14,66 \pm 0,79\%$ das células CD4⁺CD25⁺ presentes no baço dos animais controles foram positivas para a molécula CTLA-4, enquanto que nos animais diabéticos essa porcentagem foi menor, sendo cerca de $9,02 \pm 2,46\%$ ($p=0,003$). A molécula PD-1 esteve presente em $25,68 \pm 3,03$ das células CD4⁺CD25⁺ do baço dos animais controles e em apenas $15,90 \pm 2,13\%$ nos animais tratados com STZ. ($p=0,001$). A porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ que expressavam a molécula GITR foi semelhante nos dois grupos estudados, sendo que no grupo controle esta foi de $5,73 \pm 0,52\%$ e nos animais diabéticos de $4,39 \pm 1,41\%$ ($p=0,177$).

Com relação à intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células CD4⁺CD25⁺, comprovamos que houve expressão semelhante entre os grupos controle e de animais diabéticos, ou seja, essas moléculas estiveram expressas na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ em quantidades

semelhantes (Figura 20b). Os valores das IMF detectadas em ambos os grupos experimentais podem ser observados na Tabela 8.

As moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 também foram analisadas dentro da população de células $CD4^+CD25^{hi}$. Podemos observar que, dentro da população de células $CD4^+CD25^{hi}$, os animais diabéticos apresentaram menores frequências de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 quando comparadas com o grupo controle (Figura 20c). A porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1, avaliadas na *gate* de células $CD4^+CD25^{hi}$ dos animais diabéticos foi de $12,35 \pm 2,72\%$, $5,7 \pm 2,19\%$ e $22,38 \pm 2,25$, respectivamente. Já nos animais controles, a porcentagem de células positivas para essas mesmas moléculas foi de $23,04 \pm 3,86\%$ ($p=0,001$), $12,13 \pm 4,99\%$ ($p=0,036$) e $43,25 \pm 5,86\%$ ($p=0,0001$), respectivamente. Entretanto, não observamos diferenças na IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células $CD4^+CD25^{hi}$ do baço de animais controles e diabéticos (Figura 20d). Os valores das IMF podem ser vistos na Tabela 9.

Quanto à população de células T reguladoras ($Foxp3^+$), não foi possível observar diferenças significativas entre os dois grupos estudados (Figura 21a). A porcentagem de células $CD4^+CD25^{hi}$ positivas para o $Foxp3$ foi de $32,93 \pm 7,33$ no grupo controle e de $57,13 \pm 25,87\%$ nos animais tratados com STZ ($p=0,167$). Embora os animais diabéticos aparentemente mostrarem frequências maiores de células T reguladoras ($CD25^{hi}$) do que os animais controles, estas não tiveram significância estatística. A porcentagem das células T $CD4^+CD25^+$ que expressavam o fator de transcrição $Foxp3$ no baço dos animais controles foi de $52,91 \pm 29,54\%$ e nos animais diabéticos de $26,81 \pm 8,70\%$ ($p=0,189$).

Com relação à IMF do $Foxp3$, podemos observar que ela apresentou-se reduzida nas células $CD4^+CD25^{hi}$ dos animais diabéticos ($40,18 \pm 16,29$) em relação aos animais controles ($166,28 \pm 77,92$, $p=0,004$). Já na população de células $CD4^+CD25^+$, o $Foxp3$ esteve expresso de forma similar nos animais controles ($64,24 \pm 37,41$) e diabéticos ($30,38 \pm 2,94$, $p=0,052$) (Figura 21b).

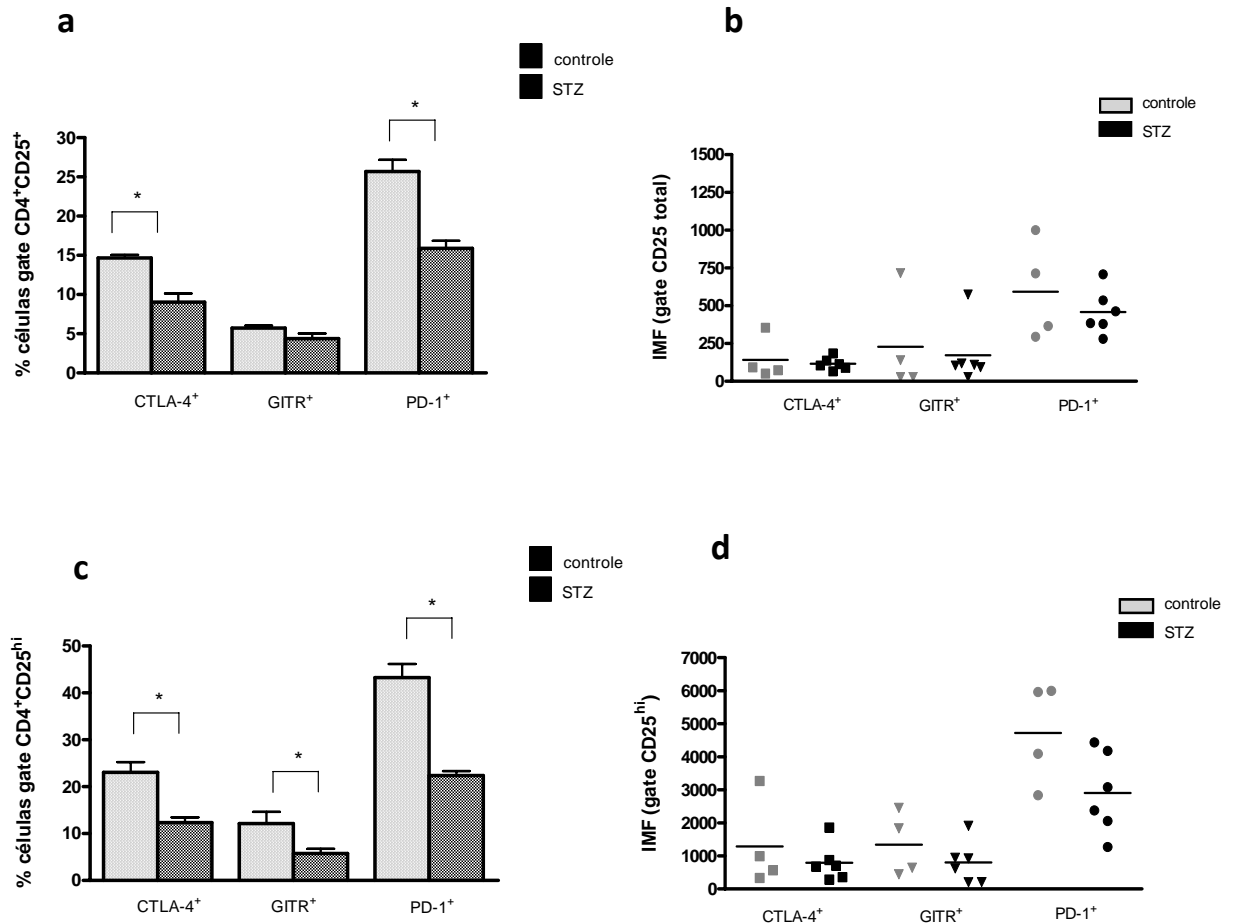


Figura 20. Análise da expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. Onze dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) Porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 e (b) IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, ambas avaliadas na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺. (c) Porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 e (d) IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, ambas avaliadas na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. Nos gráficos de dispersão, cada ponto representa o valor da IMF de um indivíduo e os traços horizontais representam a média dos valores. (* p<0,05)

Tabela 8. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após indução do diabetes.

| <i>Molécula</i> | <i>Controle (n=4)</i> <i>IMF</i> | <i>STZ (n=6)</i> <i>IMF</i> | <i>valor p</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| CTLA-4 | 142,47 ± 142,15 | 115,63 ± 40,96 | 0,663 |
| GITR | 228,48 ± 229,11 | 171,61 ± 199,58 | 0,739 |
| PD-1 | 593,60 ± 327,23 | 458,39 ± 149,30 | 0,394 |

Os valores estão representados pela média da IMF com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

Tabela 9. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após indução do diabetes.

| <i>Molécula</i> | <i>Controle (n=4)</i> <i>IMF</i> | <i>STZ (n=6)</i> <i>IMF</i> | <i>valor p</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| CTLA-4 | 1288,63 ± 1348,97 | 790,31 ± 568,66 | 0,435 |
| GITR | 1340,88 ± 962,47 | 801,71 ± 635,09 | 0,312 |
| PD-1 | 4724,28 ± 1540,88 | 2899,63 ± 1238,27 | 0,071 |

Os valores estão representados pela média da IMF com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

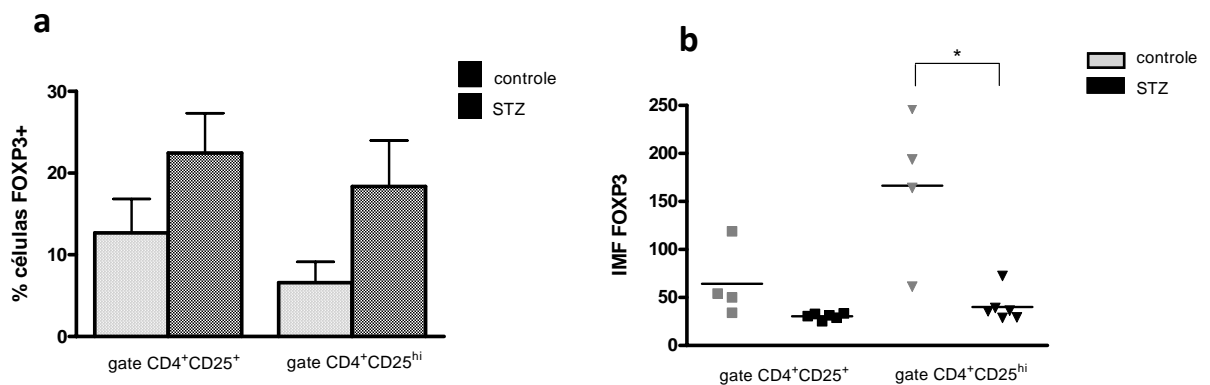


Figura 21. Análise da população de células T reguladoras Foxp3⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. Onze dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada tanto na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺ quanto na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. (b) IMF do fator Foxp3 expresso nas células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço dos animais controles e tratados com STZ. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. No gráfico de dispersão, cada ponto representa o valor da IMF de um indivíduo e os traços horizontais representam a média dos valores. (* p<0,05)

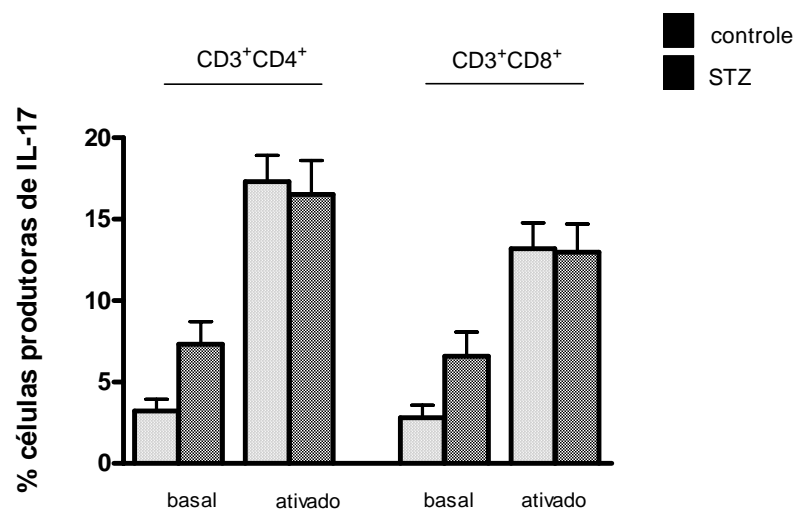


Figura 22. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-17 presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. Onze dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem, detecção de IL-17 intracelular e análise por FACS. A população de células produtoras de IL-17 foi avaliada em duas condições experimentais, sendo que na condição basal os esplenócitos foram cultivados na ausência de estímulos policlonais, e em condição de ativação eles foram cultivados por 5 horas na presença de PMA e ionomicina. A porcentagem de células produtoras de IL-17 foi avaliada tanto na *gate* de células CD3⁺CD4⁺ quanto na *gate* CD3⁺CD8⁺. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

A produção de IL-17 pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não se mostrou alterada nos grupos estudados, em ambas condições de cultivo (Figura 22). A porcentagem linfócitos T CD4⁺ que produziam IL-17, em nível basal, nos animais controles foi de $3,23 \pm 1,40\%$ enquanto que nos animais diabéticos foi de $7,32 \pm 3,38$ ($p=0,053$). Após estimulação com PMA e ionomicina essa semelhança se manteve, na qual os animais controles apresentaram frequência de $17,31 \pm 3,42\%$ de células produtoras de IL-17 dentro da *gate* de células T CD3⁺CD4⁺ e nos animais diabéticos essa porcentagem foi de $16,53 \pm 5,10\%$ ($p=0,795$). Com relação às células T CD8⁺ que produziam IL-17 em nível basal, também não foi possível observar diferenças significativas entre o grupo dos animais tratados com STZ ($6,59 \pm 3,64\%$) e os não tratados ($2,81 \pm 1,52\%$, $p=0,089$). As células que foram cultivadas na presença dos estímulos policlonais apresentaram porcentagem de células produtoras de IL-17 dentro da *gate* de células CD3⁺CD8⁺ de $13,20 \pm 3,14\%$ nos animais controles e de $12,98 \pm 4,23\%$ nos animais diabéticos ($p=0,932$).

c.2) Análises das populações celulares dos linfonodos pancreáticos

As células dos linfonodos pancreáticos foram isoladas e analisadas quanto às seguintes marcações: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25^{hi} Foxp3⁺, células T CD4⁺ produtoras de IL-17 e células T CD8⁺ produtoras de IL-17.

Os animais tratados com STZ apresentaram frequência de células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{hi} semelhante aos animais controles (Figura 23a). A porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ presentes nos linfonodos dos animais controles foi de $2,95 \pm 2,19\%$ e nos animais diabéticos de $4,68 \pm 1,99\%$ ($p=0,489$). A população de células CD4⁺CD25^{hi} representaram cerca de $1,38 \pm 0,80\%$ das células dos linfonodos pancreáticos dos animais controles e nos animais tratados com STZ essa frequência foi de $2,29 \pm 1,34\%$ ($p=0,463$).

Com relação às células T reguladoras presentes nos linfonodos pancreáticos, não observamos diferenças entre os dois grupos analisados (Figura 23b). Dentro da população de células T CD4⁺CD25⁺, cerca de $15,41 \pm 4,99\%$ dessas células foram positivas para Foxp3⁺ no grupo de animais controles, e nos animais tratados com STZ essa porcentagem foi de $24,66 \pm 3,52\%$ ($p= 0,168$). Já para a população de células T CD4⁺CD25^{hi} presentes nos linfonodos pancreáticos, a porcentagem dessas células que expressavam o fator Foxp3 foi de cerca de $17,32 \pm 7,56\%$ nos animais controles e de $20,64 \pm 9,45\%$ nos animais diabéticos ($p=0,709$).

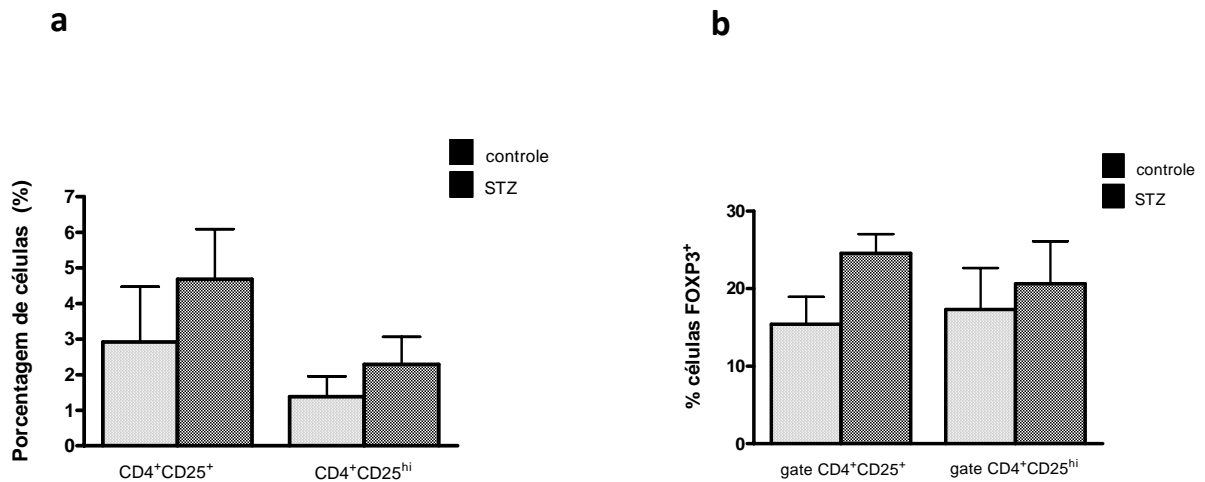


Figura 23. Análise da população de células T CD4⁺CD25⁺ e células T reguladoras Foxp3⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. Onze dias após tratamento com STZ/tampão citrato, os linfonodos pancreáticos dos animais foram coletados e as células isoladas para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) Porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{hi} presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com STZ. (b) A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada tanto na gate de células T CD4⁺CD25⁺, quanto na gate de células T CD4⁺CD25^{hi}. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

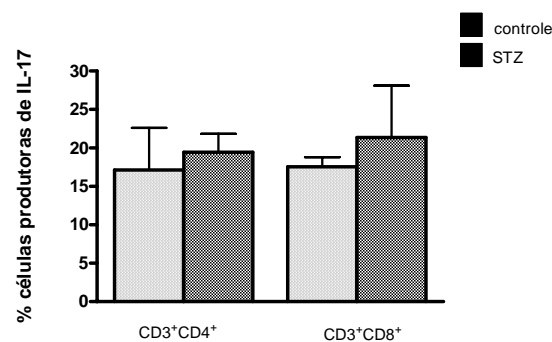


Figura 24. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-17⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. Onze dias após tratamento com STZ/tampão citrato, os linfonodos pancreáticos dos animais foram coletados e as células isoladas para imunofenotipagem, detecção de IL-17 intracelular e análise por FACS. A população de células produtoras de IL-17 foi avaliada após cultivo na presença de PMA e ionomicina por 5h (ativação). A porcentagem de células produtoras de IL-17 foi avaliada tanto na gate de células CD3⁺CD4⁺ quanto na gate CD3⁺CD8⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

Em relação às células produtoras de IL-17 não foi possível observar diferenças na quantidade dessas células em ambos os grupos de animais (Figura 24). Nos linfonodos pancreáticos dos animais controles, a porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ que produziram IL-17 foi de $17,14 \pm 9,47\%$ e nos animais diabéticos de $19,44 \pm 3,38\%$ ($p=0,772$). Com relação à população de células T CD3⁺CD8⁺, $17,54 \pm 1,76\%$ dessas células presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles produziam IL-17 e no grupo de animais que receberam as doses de STZ a porcentagem dessas células foi de $21,33 \pm 9,53\%$ ($p=0,634$).

d) Dosagem de citocinas presentes soro e homogenato pancreático dos animais controles e tratados com STZ onze dias após a indução do diabetes

Através do ensaio de ELISA feito à partir do homogenato pancreático, podemos notar que todas as citocinas estudadas, com exceção da IL-10, estiveram presentes em concentrações semelhantes nos dois grupos de animais estudados (Figura 25). A citocina IL-10 esteve presente em menores concentrações no homogenato pancreático dos animais diabéticos em comparação aos animais controles. A concentração desta citocina no pâncreas dos animais controle foi de $7,72 \pm 0,40$ ng/g de tecido e nos animais tratados com STZ de $4,31 \pm 1,95$ ng/g de pâncreas ($p=0,042$). Estes e os demais valores detectados na dosagem das citocinas IL-23, IL-17, IFN- γ , IL-6, TNF- α no homogenato pancreático estão listados na Tabela 10.

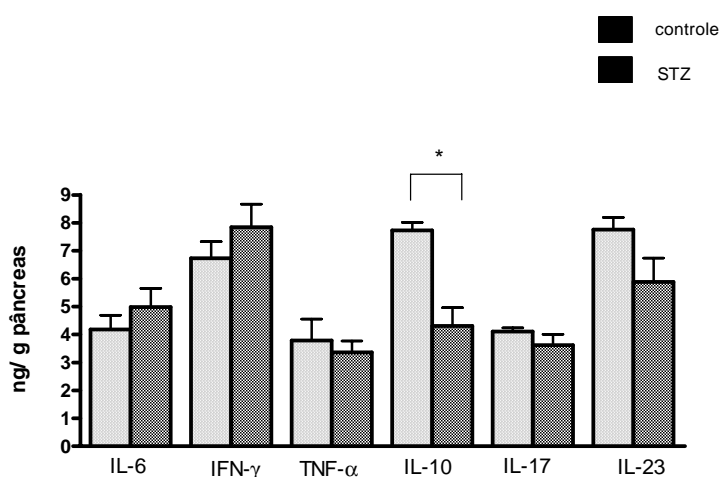


Figura 25. Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ onze dias após a indução do diabetes. Onze dias após tratamento com STZ/tampão citrato, porções do pâncreas foram coletadas, homogeneizadas na presença de inibidor de proteases e a partir do homogenato pancreático as citocinas foram quantificadas através do ensaio de ELISA. A concentração das citocinas está representada por nanograma de citocina por grama de tecido pancreático. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. (* $p < 0,05$)

Tabela 10. Concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático de camundongos controles e diabéticos onze dias após tratamento com STZ

| citocina | controle (n=4) ng/g pâncreas | STZ (n=6) ng/g pâncreas | valor p |
|---------------|---------------------------------|----------------------------|---------|
| IL-6 | 4,18 \pm 0,72 | 4,98 \pm 1,87 | 0,582 |
| IFN- γ | 6,73 \pm 0,84 | 7,83 \pm 2,18 | 0,521 |
| TNF- α | 3,78 \pm 1,09 | 3,36 \pm 1,21 | 0,665 |
| IL-10 | 7,72 \pm 0,40 | 4,31 \pm 1,95 | 0,042* |
| IL-17 | 4,11 \pm 0,18 | 3,62 \pm 1,17 | 0,585 |
| IL-23 | 7,75 \pm 0,61 | 5,88 \pm 2,26 | 0,304 |

Valores representados como média \pm desvio padrão

* p<0,05

4.1.2.3. Análises do período de 18 dias após o tratamento com STZ

a) Animais

Dezoito dias após o tratamento com STZ, a média de glicemia dos animais que receberam a droga foi de 430,66 \pm 1,41 mg/dl e nos animais controles de 107,23 \pm 19,08 mg/dl.

b) Análises histológicas do pâncreas

Através das análises histológicas (coloração com hematoxilina e eosina), foi possível notar a persistência de intenso infiltrado inflamatório nas ilhotas, contribuindo desta forma para o processo de invasão e destruição das células beta pancreáticas (Figura 26). A coloração de Gomori's e as reações de imunohistoquímica para insulina evidenciaram a extensa destruição das células produtoras de insulina, uma vez que raras regiões das ilhotas foram coradas ou marcadas (Figura 27).

Com relação às células alfa produtoras de glucagon, podemos observar pequenas diferenças na marcação positiva nas ilhotas dos animais controles e diabéticos. Nos animais controles, a massa de células alfa localizou-se na periferia das ilhotas, enquanto que nos

animais diabéticos, foi possível observar células alfa no interior da ilhotas, sugerindo uma proliferação desorganizada dessas células na tentativa de compensar o dano tecidual proveniente da células beta que foram destruídas (Figura 28).

c) Imunofenotipagem das populações celulares e linfocitárias do baço e linfonodos pancreáticos dezoito dias após indução do diabetes.

Dezoito dias após a última dose de STZ, o baço e linfonodos pancreáticos foram retirados dos animais controles (n=4) e dos animais diabéticos (n=6) para verificar alterações sistêmicas (baço) ou locais (linfonodos pancreáticos) que possivelmente ocorreram durante a progressão da doença. Não foi possível observar diferenças acerca do número absoluto de células totais presentes no baço e linfonodos pancreáticos de ambos os grupos analisados. No grupo controle, o número de células totais presentes no baço dos animais foi de $9,3 \pm 0,56 \times 10^7$ células e nos animais tratados com STZ de $8,51 \pm 0,47 \times 10^7$ células ($p=0,188$). Com relação aos linfonodos pancreáticos, o número absoluto total de células nos linfonodos dos animais controles foi de $3,6 \pm 0,20 \times 10^6$ células e nos animais diabéticos de $3,80 \pm 0,12 \times 10^6$ células ($p=0,177$).

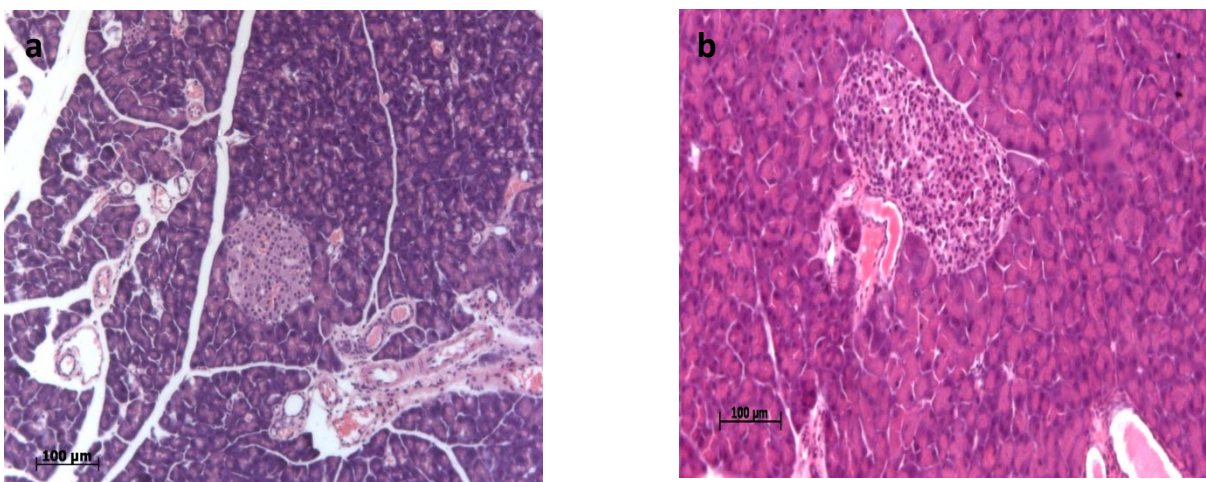


Figura 26. Análise histológica do pâncreas de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a $5\mu\text{m}$, corado com hematoxilina-eosina e visualizado em microscópio óptico. (a) Ilhota pancreática de camundongo controle, exibindo morfologia arredondada típica, ausente de células inflamatória infiltradas, aumento 100x. (b,c) Dezoito dias após a administração das múltiplas doses de STZ, o pâncreas dos animais exibiram células infiltradas no interior das ilhotas pancreáticas, aumento 100x.

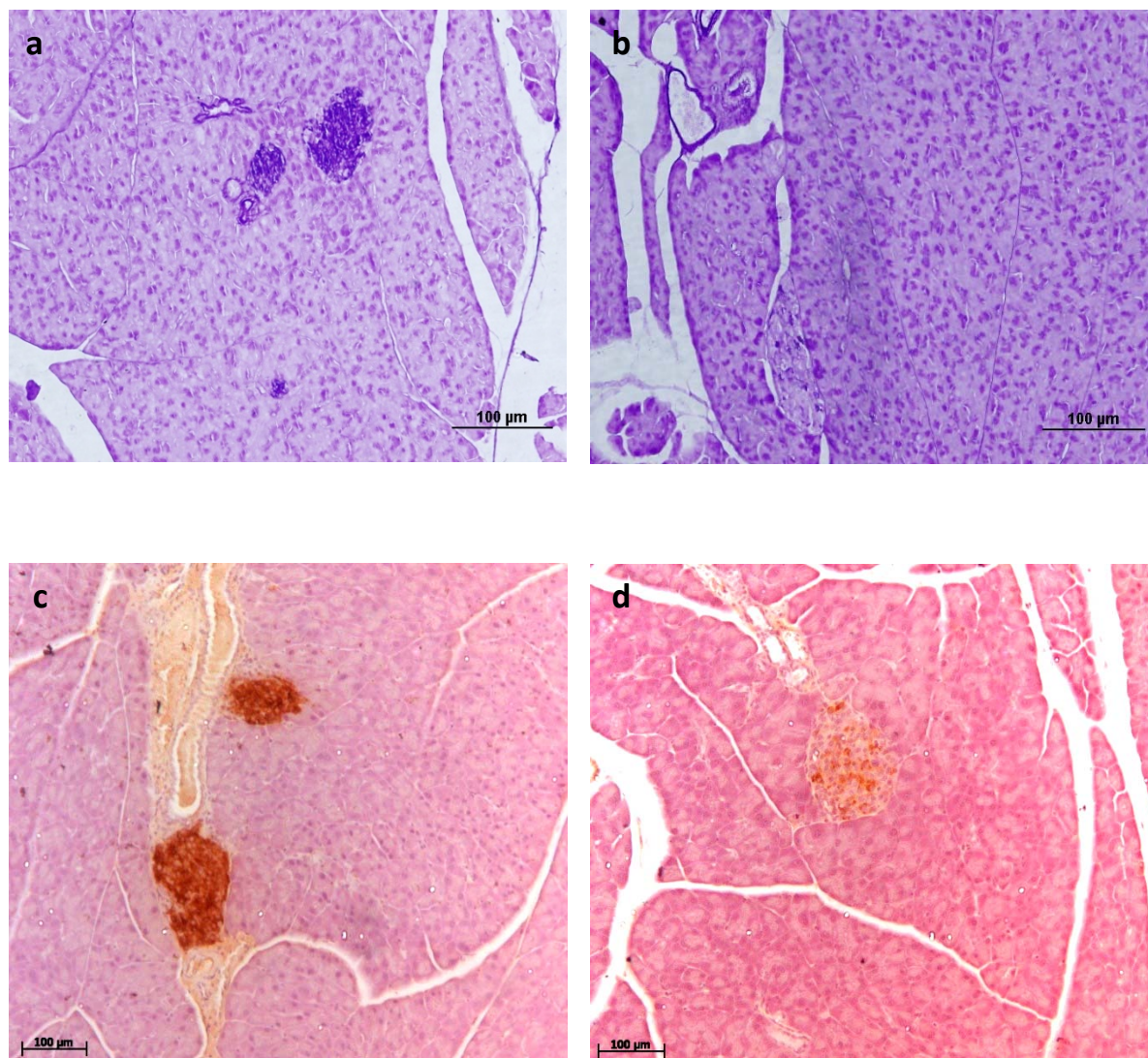


Figura 27. Análise da massa de células beta produtoras de insulina nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5µm, corado com a coloração de Gomori's (a,b) ou realizada reação de imunohistoquímica (streptavidina/peroxidase) para insulina (c,d). (a,c) Ilhotas pancreáticas de camundongos controles exibindo densa massa de células beta produtoras de insulina, evidenciada pela intensa coloração de Gomori's (a) e forte marcação para insulina (c), aumento 100x. (b,d) Dezoito dias após a administração das cinco doses consecutivas de STZ, as ilhotas pancreáticas dos animais tratados apresentaram intensa destruição das células beta produtoras de insulina, uma vez que a coloração de Gomori's (b) e a intensidade da marcação para insulina (d) diminuiram drasticamente em relação ao grupo controle, aumento 100x.

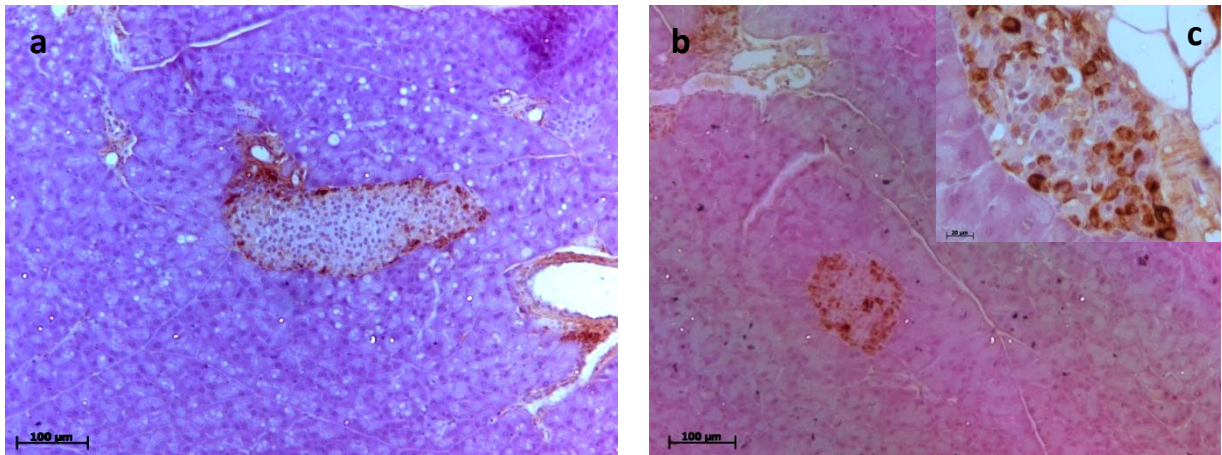


Figura 28. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5 μ m e posteriormente realizada reação de imunohistoquímica (streptavidina/peroxidase) para glucagon. (a) Ilhota pancreática de camundongo controle exibindo a localização periférica da massa de células alfa produtoras de glucagon, aumento 100x. (b,c) Dezoito dias após a administração das múltiplas doses de STZ, as ilhotas pancreáticas dos animais tratados apresentaram padrão desorganizado de distribuição das células alfa, uma vez que algumas células marcadas puderam ser vistas ocupando o interior da ilhota pancreática, aumento 100 e 400x, respectivamente.

c.1) Análises das populações celulares do baço

Dezoito dias após o tratamento com STZ, o baço dos animais diabéticos apresentaram frequências de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, macrófagos e células dendríticas semelhantes aos dos animais controles (Figura 29). A porcentagem de linfócitos T *helper* no baço dos animais controle foi de $19,73 \pm 1,67\%$ e nos animais diabéticos de $18,61 \pm 0,55\%$ ($p= 0,159$). A porcentagem de células T CD3⁺CD8⁺ presentes no baço dos animais controles ($13,32 \pm 1,17\%$) também foi semelhante a dos animais diabéticos ($12,27 \pm 1,38$, $p=0,096$). Podemos observar também uma frequência equivalente de macrófagos (CD11b⁺) no baço dos animais controles ($2,79 \pm 0,92\%$) em relação aos tratados com STZ ($2,60 \pm 1,00\%$; $p=0,772$). A população de células dendríticas (CD11c⁺) apresentou-se semelhante nos dois grupos analisados, onde a porcentagem dessas células encontradas no baço dos animais controles foi de $6,40 \pm 1,31\%$ e nos animais diabéticos de $5,59 \pm 1,07\%$ ($p=0,315$).

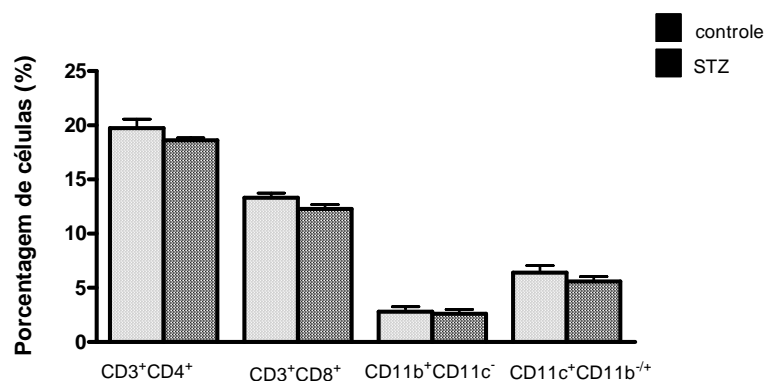


Figura 29. Análise das populações de células T CD4⁺, T CD8⁺, macrófagos e células dendríticas presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. Dezoito dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. A população de linfócitos T *helper* foi avaliada com base na marcação dupla positiva para CD3⁺CD4⁺, os linfócitos T citotóxicos como CD3⁺CD8⁺, os macrófagos foram caracterizados com base na marcação CD11b⁺CD11c⁻, e a população de células dendríticas foram identificadas através das marcações CD11b⁺CD11c⁺/CD11b⁻CD11c⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

As populações de células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{hi} também mostraram-se presentes em quantidades semelhantes no baço dos animais controles e diabéticos (Figura 30). No baço dos animais controles, a porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ encontrada foi de 4,09 ± 1,10% e nos animais tratados com STZ de 3,71 ± 0,71% (p=0,520). Já a população CD4⁺CD25^{hi} esteve presente na frequência de 0,68 ± 0,45% no baço do grupo controle e de 0,41 ± 0,29% no grupo diabético (p=0,283).

Neste período, estudamos também as moléculas de propriedades regulatórias (CTLA-4, GITR e PD-1) expressas nas células T CD4⁺CD25⁺ do baço dos dois grupos de animais (Figura 31a). A porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ que expressavam as moléculas GITR, CTLA-4 e PD-1 foi semelhante nos dois grupos de animais estudados (p=0,908, p=0,619 e p=0,618, respectivamente). No grupo controle, a porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ que foram positivas para GITR, CTLA-4 e PD-1 foi de 31,45 ± 10,48%; 22,77 ± 15,10% e 35,99 ± 12,12%, respectivamente. No grupo que recebeu o tratamento com STZ, 32,39 ± 10,09% das células T CD4⁺CD25⁺ eram positivas para CTLA-4, 27,70 ± 9,87% eram positivas para GITR e 30,58 ± 14,11% para PD-1.

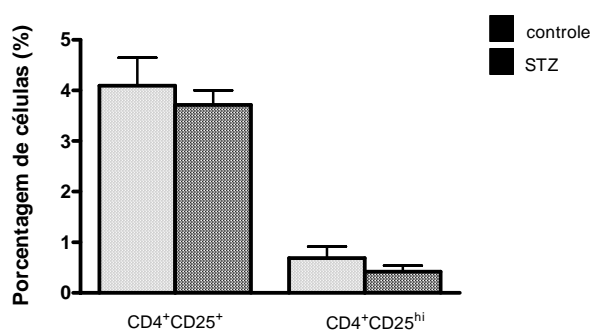


Figura 30. Análise das populações de células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. Dezoito dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

Com relação a IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25⁺, nossos resultados revelaram maior expressão dessas moléculas na superfície das células provenientes do baço dos animais diabéticos em comparação com os animais controles (Figura 31b). Os valores das IMF estão listadas na Tabela 11.

Foi analisado também a expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4⁺CD25^{hi}, e não foi possível observar diferenças na porcentagem de células positivas para estas moléculas nos dois grupos estudados (Figura 31c). A porcentagem de células positivas para CTLA-4, avaliada dentro da *gate* de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, no baço dos animais controles foi de $24,06 \pm 5,98\%$ e nos animais diabéticos de $30,30 \pm 9,06\%$ ($p=0,322$). Para as moléculas GITR e PD-1, a porcentagem foi de respectivamente: $26,27 \pm 6,77\%$ e $34,25 \pm 5,57\%$ no grupo controle e de $29,88 \pm 18,98\%$ ($p=0,729$) e $30,04 \pm 10,53\%$ ($p=0,689$) no grupo tratado com STZ.

Com relação à IMF das moléculas estudadas, só foi possível observar diferenças significativas na IMF da molécula PD-1 na superfície das células T CD4⁺CD25^{hi} do grupo controle em comparação com o grupo diabético (Figura 31d). A IMF do PD-1 no grupo controle foi de $376,84 \pm 147,15$ e no grupo de animais diabéticos a IMF elevou-se para $1145,58 \pm 590$ ($p=0,036$). Os valores das IMF das outras moléculas estudadas podem ser vistas na Tabela 12.

A porcentagem de células T reguladoras (Foxp3⁺), avaliada dentro das populações de células CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{hi}, mostrou-se semelhante entre os dois grupos analisados (Figura 32a). Nos animais controles, a porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ que expressavam o fator de transcrição Foxp3 foi de $40,46 \pm 11,66\%$ e nos animais diabéticos foi de $36,11 \pm 10,51\%$ ($p=0,574$). A porcentagem de células CD4⁺CD25^{hi} positivas para Foxp3 foi de $30,24 \pm 16,12\%$ no grupo controle e de $31,16 \pm 10,89\%$ no grupo diabético ($p=0,921$).

A IMF do fator de transcrição Foxp3 não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos estudados, seja na análise feita dentro da gate de células T CD4⁺CD25⁺ quanto CD4⁺CD25^{hi} (Figura 32b). A IMF do Foxp3, analisada dentro da população de células CD4⁺CD25⁺, foi de $62,53 \pm 25371$ no grupo de animais controles e de $71,81 \pm 55,31$ no grupo de animais diabéticos ($p=0,764$). Já quando a análise foi feita dentro da população de células CD4⁺CD25^{hi}, a IMF no grupo controle foi de $417,90 \pm 122,15$ e no grupo tratado com STZ de $324,46 \pm 137,73$ ($p=0,305$).

Através do ensaio de citocina intracelular realizado para detectar as células produtoras de IL-17, foi possível observar que essas células estiveram presentes no baço dos animais em quantidades semelhantes em ambos grupos experimentais, independente da sua forma de cultivo (na presença ou ausência de estímulos policlonais) (Figura 33). A porcentagem de células T CD4⁺ que produziam IL-17 em nível basal foi de $5,62 \pm 1,25\%$ nos animais controles e de $6,72 \pm 3,26\%$ nos animais diabéticos ($p=0,601$). Uma vez ativados, a porcentagem das células produtoras dessa citocina foi para $14,34 \pm 2,14\%$ no grupo controle e para $13,52 \pm 4,41\%$ no grupo diabético ($p=0,776$). Com relação às células T CD8⁺ em condições basais, a porcentagem desse tipo celular que produzia IL-17 no baço dos animais controles foi de $4,72 \pm 1,75\%$ e nos animais diabéticos foi de $5,15 \pm 3,55$ ($p=0,848$). Após ativação, a porcentagem de células T CD8⁺ produtoras de IL-17 no grupo controle foi de $10,41 \pm 2,46\%$ e de $10,46 \pm 5,50\%$ no grupo diabético ($p=0,989$).

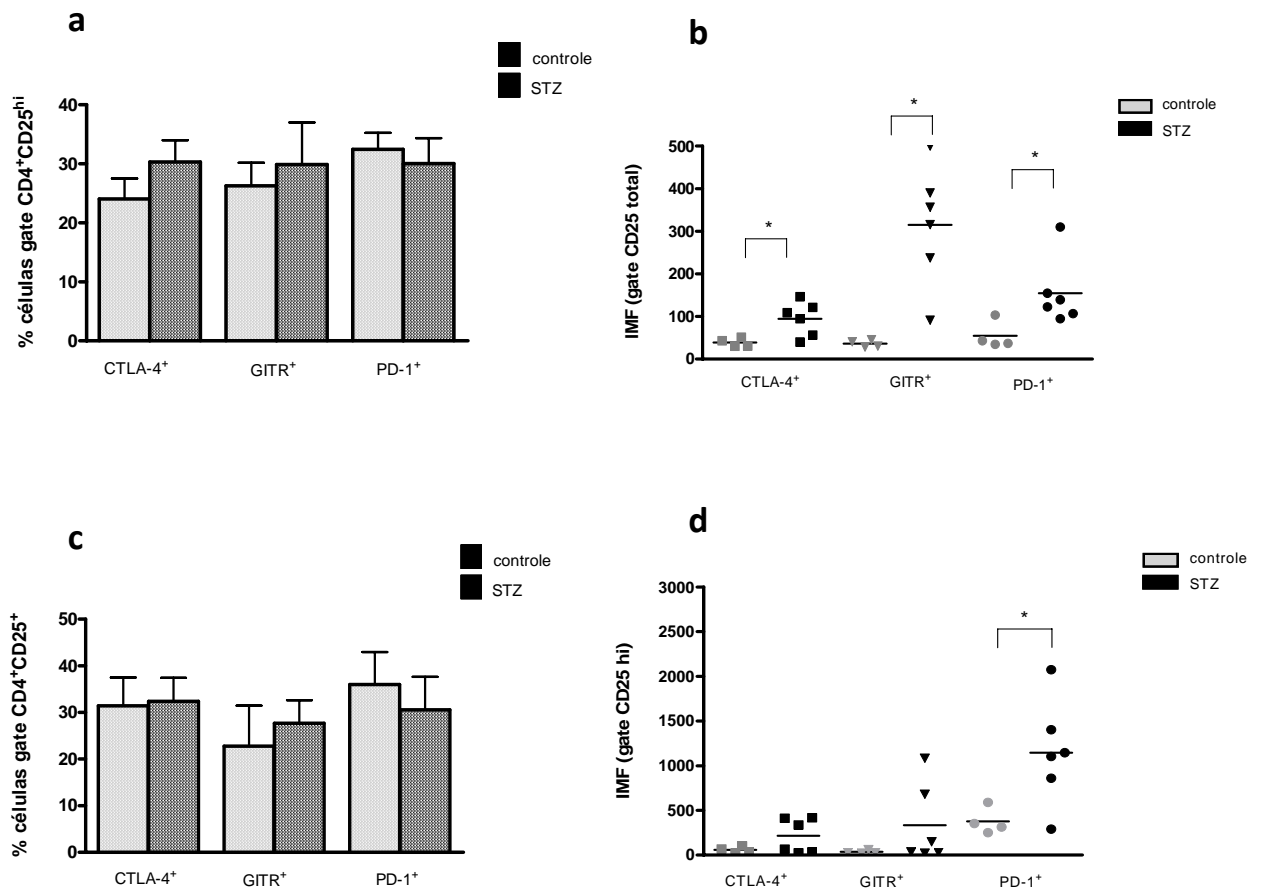


Figura 31. Análise da expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. Dezoito dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) Porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 e (b) IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, ambas avaliadas na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺. (c) Porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 e (d) IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, ambas avaliadas na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. Nos gráficos de dispersão, cada ponto representa o valor da IMF de um indivíduo e os traços horizontais representam a média dos valores. (* p<0,05)

Tabela 11. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes.

| <i>Molécula</i> | <i>Controle (n=4)</i> <i>IMF</i> | <i>STZ (n=6)</i> <i>IMF</i> | <i>valor p</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| CTLA-4 | 49,79 ± 18,71 | 170,2 ± 19,58 | 0,001* |
| GITR | 52,87 ± 8,34 | 120,78 ± 53,95 | 0,040* |
| PD-1 | 26,63 ± 1,92 | 41,99 ± 12,58 | 0,021* |

Os valores estão representados pela média da IMF com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

Tabela 12. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes.

| <i>Molécula</i> | <i>Controle (n=4)</i> <i>IMF</i> | <i>STZ (n=6)</i> <i>IMF</i> | <i>valor p</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| CTLA-4 | 58,20 ± 36,33 | 216,20 ± 192,53 | 0,150 |
| GITR | 36,07 ± 17,46 | 333,82 ± 446,36 | 0,227 |
| PD-1 | 376,84 ± 147,15 | 1145,58 ± 590,52 | 0,036* |

Os valores estão representados pela média da IMF com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

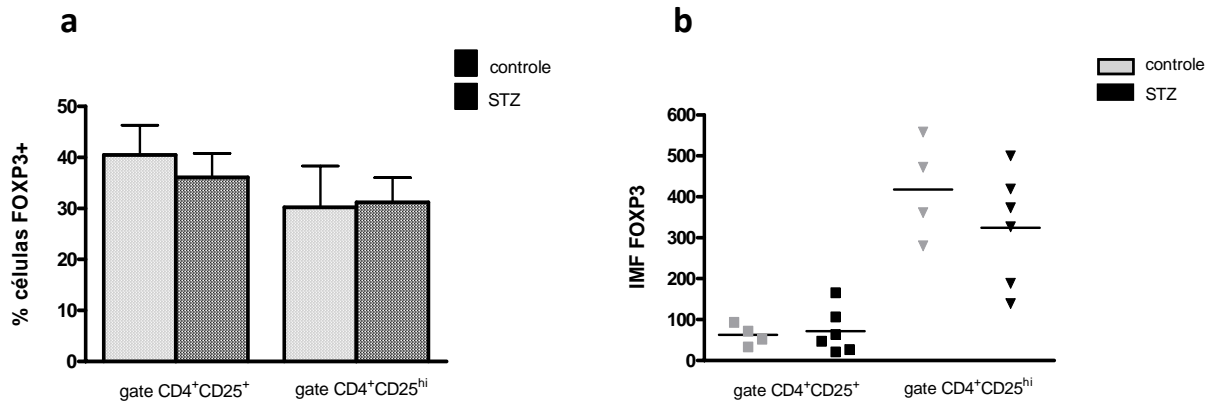


Figura 32. Análise da população de células T reguladoras Foxp3⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. Dezoito dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada tanto na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺ quanto na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. (b) IMF do fator Foxp3 expresso nas células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço dos animais controles e tratados com STZ. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. No gráfico de dispersão, cada ponto representa o valor da IMF de um indivíduo e os traços horizontais representam a média dos valores. (* p<0,05)

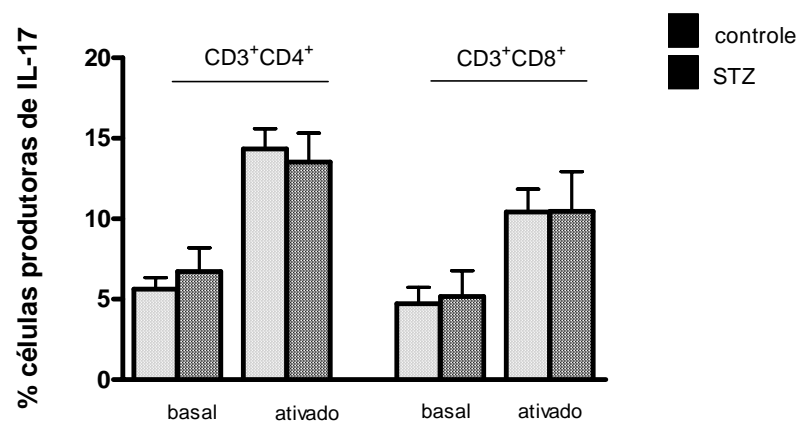


Figura 33. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-17 presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. Dezoito dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem, detecção de IL-17 intracelular e análise por FACS. A população de células produtoras de IL-17 foi avaliada em duas condições experimentais, sendo que na condição basal os esplenócitos foram cultivados na ausência de estímulos policlonais, e em condição de ativação eles foram cultivados por 5 horas na presença de PMA e ionomicina. A porcentagem de células produtoras de IL-17 foi avaliada tanto na *gate* de células CD3⁺CD4⁺ quanto na *gate* CD3⁺CD8⁺. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

c.2) Análises das populações celulares dos linfonodos pancreáticos

A porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes nos linfonodos pancreáticos mostrou-se semelhante nos dois grupos de animais estudados. No grupo controle, cerca de $2,19 \pm 0,61\%$ das células dos linfonodos pancreáticos possuíam o fenótipo de células T CD4⁺CD25⁺ e no grupo tratado com STZ essa frequência foi de $2,95 \pm 0,38\%$ ($p=0,301$). Com relação à população de células T CD4⁺CD25^{hi}, esta representou $1,16 \pm 0,67\%$ das células dos linfonodos pancreáticos dos animais controles e $1,05 \pm 0,39\%$ ($p=0,74$) nos animais tratados com STZ (Figura 34a).

Podemos notar através da Figura 34b que não foi possível observar diferenças significativas na porcentagem de células T reguladoras (Foxp3⁺) presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e diabéticos. Cerca de $45,90 \pm 4,62\%$ das células T CD4⁺CD25⁺ dos linfonodos pancreáticos do grupo controle expressavam o fator de transcrição Foxp3 e no grupo tratado com STZ essa porcentagem foi de $50,61 \pm 2,29\%$ ($p=0,325$). Para a população de células T CD4⁺CD25^{hi}, observamos que $28,44 \pm 15,85\%$ dessas células mostraram-se positivas para Foxp3 nos animais controles e $43,1 \pm 13,11\%$ nos animais diabéticos ($p=0,083$).

Estudamos também a população de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-17 (células Th17 e Tc17, respectivamente). Com relação às células T CD4⁺ que produziram IL-17, sua porcentagem nos animais controles foi de $15,18 \pm 2,26\%$ e nos animais diabéticos foi de $15,83 \pm 1,80\%$ ($p=0,648$). De maneira similar, não detectamos diferenças na porcentagem das células T CD8⁺ produtoras de IL-17, visto que sua porcentagem no grupo controle foi de $15,53 \pm 2,86\%$ e no grupo diabético de $15,53 \pm 2,86\%$ ($p=0,819$) (Figura 35).

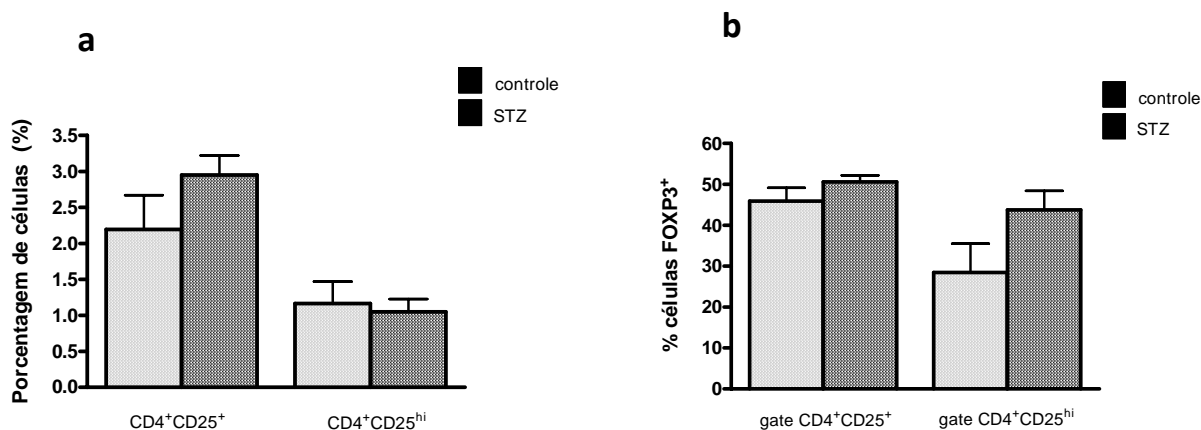


Figura 34. Análise da população de células T CD4⁺CD25⁺ e células T reguladoras Foxp3⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. Dezoito dias após tratamento com STZ/tampão citrato, os linfonodos pancreáticos dos animais foram coletados e as células isoladas para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) Porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço dos animais controles e tratados com STZ. (b) A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada tanto na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺, quanto na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

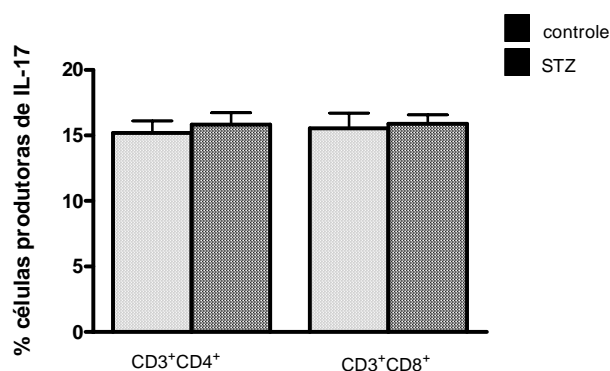


Figura 35. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-17⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. Dezoito dias após tratamento com STZ/tampão citrato, os linfonodos pancreáticos dos animais foram coletados e as células isoladas para imunofenotipagem, detecção de IL-17 intracelular e análise por FACS. A população de células produtoras de IL-17 foi avaliada após cultivo na presença de PMA e ionomicina por 5h (ativação). A porcentagem de células produtoras de IL-17 foi avaliada tanto na *gate* de células CD3⁺CD4⁺ quanto na *gate* CD3⁺CD8⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

d) Dosagem de citocinas presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com STZ dezoito dias após a indução do diabetes.

Através do ensaio de ELISA, não foi possível observar diferenças significativas na concentração das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 detectadas no homogenato pancreático dos animais controles e diabéticos (Figura 36). Os valores da quantificação dessas citocinas estão listadas na Tabela 13.

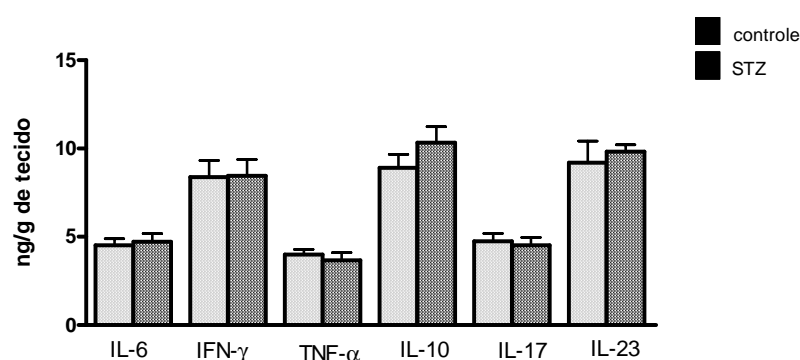


Figura 36. Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ dezoito dias após a indução do diabetes. Dezoito dias após tratamento com STZ/tampão citrato, porções do pâncreas foram coletadas, homogeneizadas na presença de inibidor de proteases e a partir do homogenato pancreático as citocinas foram quantificadas através do ensaio de ELISA. A concentração de citocina está representada por nanograma de citocina por grama de tecido pancreático. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. (* $p < 0,05$)

Tabela 13. Concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático de camundongos controles e diabéticos dezoito dias após tratamento com STZ.

| citocina | controle (n=4) ng/g tecido | STZ (n=6) ng/g tecido | valor p |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|---------|
| IL-6 | 4,51 \pm 0,74 | 4,71 \pm 1,12 | 0,764 |
| IFN- γ | 8,38 \pm 1,87 | 8,46 \pm 2,23 | 0,955 |
| TNF- α | 3,98 \pm 0,56 | 3,66 \pm 1,08 | 0,594 |
| IL-10 | 8,90 \pm 1,52 | 10,33 \pm 2,20 | 0,296 |
| IL-17 | 4,74 \pm 0,90 | 4,51 \pm 1,11 | 0,738 |
| IL-23 | 9,19 \pm 3,67 | 9,82 \pm 0,86 | 0,719 |

4.1.2.4. Análises do período de 25 dias após o tratamento com STZ

a) Animais

Vinte e cinco dias após a administração das múltiplas doses de STZ, os animais tratados com a droga apresentaram média de glicemia de $420,16 \pm 84,82$ mg/dl e nos animais utilizados como controles a média da taxa glicêmica foi de $121,11 \pm 11,16$ mg/dl.

b) Análises histológicas do pâncreas

Comparando as ilhotas pancreáticas dos animais tratados com STZ e dos animais controles, foi possível observar mudanças na arquitetura e morfologia das ilhotas. Como mostrado na Figura 37, as ilhotas pancreáticas dos animais que foram tratados com STZ assumiram uma forma estrelada ao invés da forma arredondada, sendo esta última típica dos animais não diabéticos (controles). Além disso, foi possível notar nos animais diabéticos uma diminuição de células (coloração dos núcleos) que compõem as ilhotas, bem como a presença de vacuolizações no interior das ilhotas, sugerindo destruição e lesão tecidual. Entretanto, neste período da doença não foi possível identificar infiltrado inflamatório ao redor das ilhotas pancreáticas.

Através da coloração de Gomori's (Figura 38a) e pelas análises de imunohistoquímica para insulina (Figura 38b) foi possível observar uma perda quase total da massa de células beta nos animais que receberam as doses de STZ em relação aos animais controles. Através da técnica de Gomori's, verificamos ausência de coloração para insulina nas ilhotas e na reação de imunohistoquímica a marcação para insulina mostrou-se drasticamente reduzida nos animais diabéticos quando comparada com os animais controles. Com relação à massa de células alfa produtoras de glucagon, podemos observar uma maior densidade dessas células nas ilhotas dos animais diabéticos em comparação com os animais controles, além da ocupação desorganizada destas células dentro das ilhotas pancreáticas. (Figura 39).

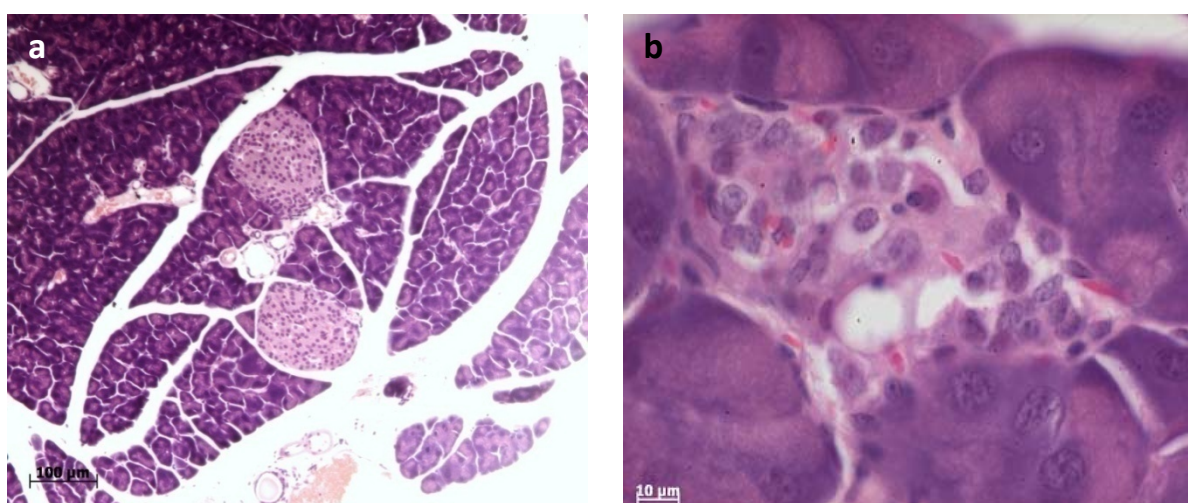


Figura 37. Análise histológica do pâncreas de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5μm, corado com hematoxilina-eosina e visualizado em microscópio óptico. (a) Ilhota pancreática de camundongo controle, exibindo morfologia arredondada típica, ausente de células inflamatória infiltradas, aumento 400x. (b,c) Vinte e cinco dias após a administração das múltiplas doses de STZ, o pâncreas dos animais exibiram ausência de processo inflamatório e ilhotas pancreáticas com morfologia atípica, resultado de uma destruição intensa das células beta produtoras de insulina, aumento 400x.

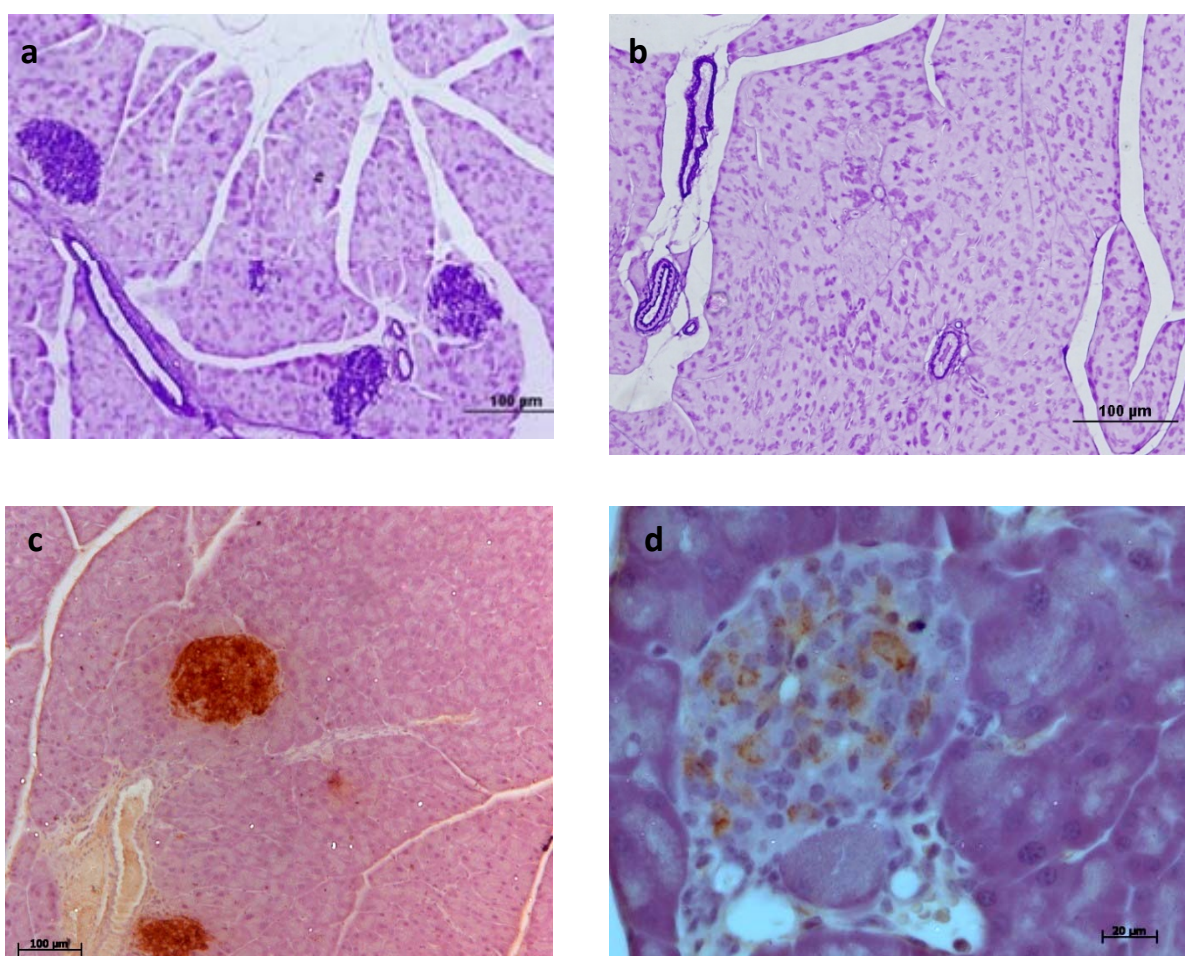


Figura 38. Análise da massa de células beta produtoras de insulina nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5µm, corado com a coloração de Gomori's (a,b) ou realizada reação de imunohistoquímica (streptavidina/peroxidase) para insulina (c,d). (a,c) Ilhotas pancreáticas de camundongos controles exibindo densa massa de células beta produtoras de insulina, evidenciada pela intensa coloração de Gomori's (a) e forte marcação para insulina (c), aumento 100x. (b,d) Vinte e cinco dias após a administração das cinco doses consecutivas de STZ, as ilhotas pancreáticas dos animais tratados apresentaram intensa destruição das células beta produtoras de insulina, uma vez que a coloração de Gomori's (b) e a intensidade da marcação para insulina (d) diminuíram drasticamente em relação ao grupo controle, aumento 100x.

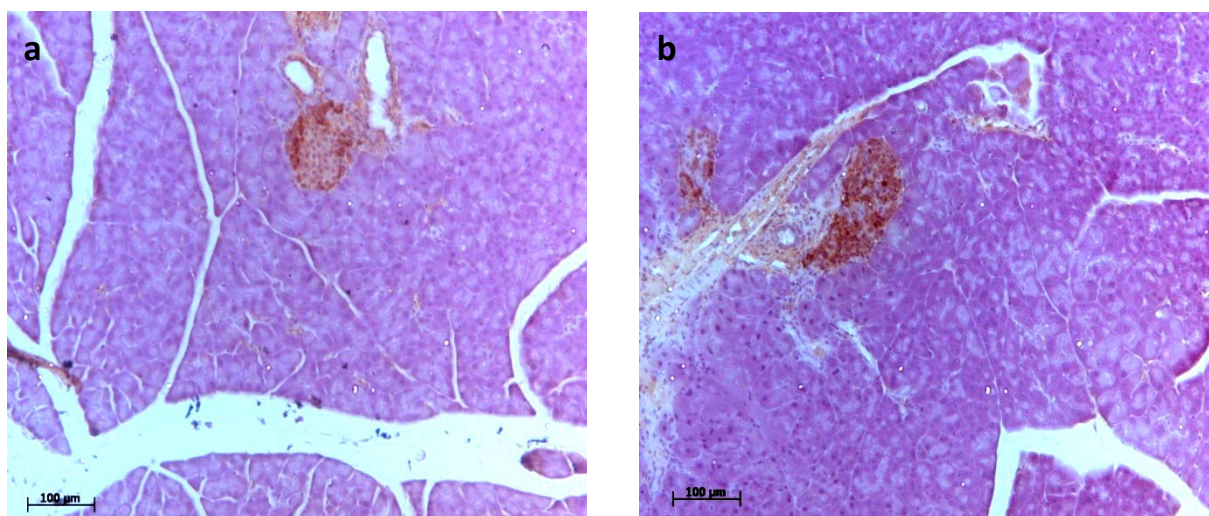


Figura 39. Análise da massa de células alfa produtoras de glucagon nos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5µm e posteriormente realizada reação de imunohistoquímica (streptavidina/peroxidase) para glucagon. (a) Ilhota pancreática de camundongo controle exibindo a localização periférica da massa de células alfa produtoras de glucagon, aumento 100x. (b) Vinte e cinco dias após a administração das múltiplas doses de STZ, as ilhotas pancreáticas dos animais tratados apresentaram aumento da densidade das células alfa e padrão de distribuição alterada das células produtoras de glucagon, uma vez que podemos visualizar essas células distribuídas por toda região da ilhota pancreática, aumento 100x.

d) Imunofenotipagem das populações celulares e linfocitárias do baço e linfonodos pancreáticos vinte e cinco dias após a indução do diabetes.

O número absoluto de células totais presentes no baço dos animais controles ($7,52 \pm 1,20 \times 10^7$ células) e diabéticos ($7,37 \pm 2,19 \times 10^7$ células) foi semelhante ($p=0,904$). A mesma relação pode ser observada para o número absoluto de células dos linfonodos pancreáticos dos animais controles ($5,54 \pm 0,07 \times 10^6$ células) e tratados com STZ ($6,20 \pm 0,98 \times 10^6$ células, $p=0,397$).

c.1) Análises das populações celulares baço

A porcentagem de células T $CD3^+CD4^+$ do baço apresentou-se de forma similar nos animais controles e diabéticos (Figura 40). A porcentagem dessas células nos animais controles foi de $17,99 \pm 2,19\%$ e nos diabéticos de $19,58 \pm 1,76\%$ ($p=0,238$). Com relação à população de células T $CD3^+CD8^+$, esta também se apresentou em frequências semelhantes no baço dos animais controles ($12,58 \pm 0,97\%$) e animais tratados com STZ ($11,54 \pm 1,35\%$, $p=0,226$). Tanto a população de macrófagos, quanto de células dendríticas estiveram

igualmente presentes no baço dos dois grupos de animais analisados. A porcentagem de macrófagos ($CD11b^+$) no baço dos animais controles foi de $1,95 \pm 0,40\%$ e nos animais diabéticos de $2,38 \pm 1,23\%$ ($p=0,529$). A frequência de células dendríticas no baço dos animais controles foi de $8,61 \pm 4,07\%$ no dos animais que receberam as dose de STZ de $5,69 \pm 1,35\%$ ($p=0,170$)

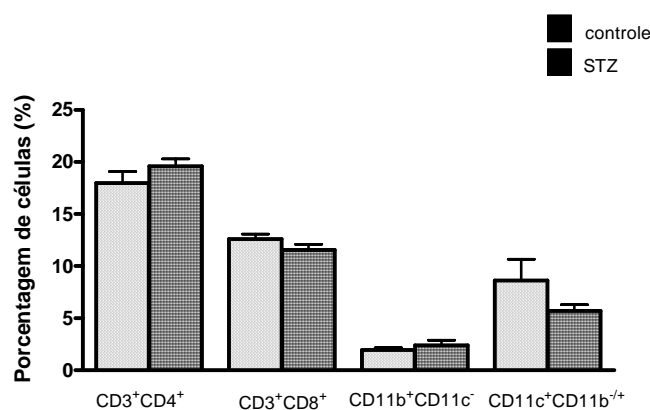


Figura 40. Análise das populações de células T $CD4^+$, T $CD8^+$, macrófagos e células dendríticas presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. Vinte e cinco dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. A população de linfócitos T *helper* foi avaliada com base na marcação dupla positiva para $CD3^+CD4^+$, os linfócitos T citotóxicos como $CD3^+CD8^+$, os macrófagos foram caracterizados com base na marcação $CD11b^+CD11c^-$, e a população de células dendríticas foram identificadas através das marcações $CD11b^+CD11c^+/CD11b^+CD11c^+$. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* $p<0,05$)

A porcentagem de células T $CD4^+CD25^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}$ presentes no baço mostrou-se similar nos animais controles e diabéticos (Figura 41). No grupo controle, a porcentagem das células T $CD4^+CD25^+$ presentes no baço foi de $2,21 \pm 0,65\%$ e no grupo tratado com STZ foi de $2,06 \pm 0,75\%$ ($p=0,751$). Com relação à população de células T $CD4^+CD25^{hi}$, a frequência destas células no baço dos animais controles foi de $0,55 \pm 0,14\%$ e nos animais diabéticos de $0,68 \pm 0,44\%$ ($p=0,502$).

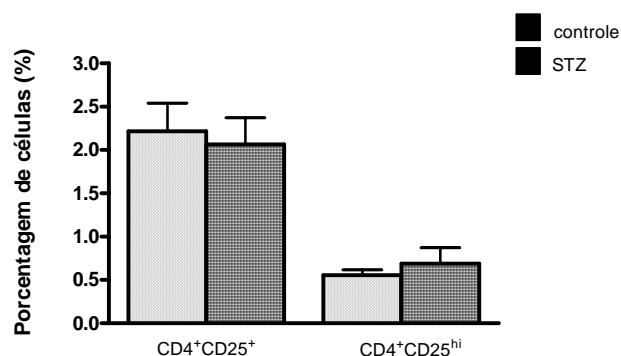


Figura 41. Análise das populações de células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. Vinte e cinco dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

As células da *gate* CD4⁺CD25⁺ foram analisadas quanto à expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, e foi observado que a porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ que expressavam essas moléculas na superfície não diferiu entre os dois grupos analisados (Figura 42a). No grupo controle, a porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ que expressam CTLA-4, GITR e PD-1 foi de 15,51 ± 2,80%; 13,69 ± 3,11% e 23,91 ± 6,11%, respectivamente. No grupo de animais diabéticos, esses valores foram muito semelhantes, onde a porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ que expressavam CTLA-4 foi de 14,38 ± 9,84% (p=0,888), GITR de 14,39 ± 11,49% (p=0,939) e PD-1 de 23,22 ± 11,86% (p=0,944).

Embora a frequência de células CD4⁺CD25⁺ que expressavam as moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 mostraram-se semelhantes nos dois grupos de animais analisados, a IMF dessas moléculas foi diferente entre os grupos (Figura 42b). Todas as moléculas apareceram maior expressão na superfície das células provenientes do baço dos animais que foram tratados com STZ em comparação com os animais controles (p<0,05). O valor da IMF das moléculas analisadas podem ser vistos na Tabela 14.

Com relação à população de células CD4⁺CD25^{hi}, também não foi possível observar diferenças significativas na porcentagem dessas células positivas para as moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 em ambos grupos analisados (Figura 42c). Em relação ao grupo controle, a porcentagem de células, avaliada dentro da população de linfócitos T CD4⁺CD25^{hi}, positivas

para as moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 foi de, respectivamente: $17,31 \pm 4,51\%$, $18,50 \pm 7,70\%$ e $22,55 \pm 3,95\%$. O grupo que foi tratado com STZ apresentou porcentagens semelhantes ao grupo controle, sendo que para a molécula CTLA-4 cerca de $14,37 \pm 6,29\%$ das células $CD4^+CD25^{hi}$ mostraram-se positivas para esta molécula ($p=0,615$), para o GITR a porcentagem de células positivas foi de $23,47 \pm 12,45\%$ ($p=0,642$) e para o PD-1 de $21,88 \pm 3,07\%$ ($p=0,828$).

Com relação à IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T $CD4^+CD25^{hi}$, podemos observar que as moléculas GITR e PD-1 estiveram mais expressas na superfície das células do baço dos animais diabéticos em comparação com os animais controles (Figura 42d). Os valores das IMF podem ser visualizados na Tabela 15.

A expressão do fator de transcrição Foxp3 foi analisado na população de células T $CD4^+CD25^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}$, e através das análises não foi possível observar diferenças na frequência dessas células no baço dos animais controles e animais diabéticos (Figura 43a). A porcentagem de células positivas para Foxp3, analisada dentro da população de células T $CD4^+CD25^+$, foi de $21,59 \pm 8,10\%$ nos animais controles e de $21,25 \pm 1,93\%$ nos animais diabéticos ($p=0,928$). Com relação à população de células T $CD4^+CD25^{hi}$, cerca de $17,04 \pm 3,33\%$ dessas células foram positivas para Foxp3 no grupo controle, e no grupo tratado com STZ essa porcentagem foi de $16,30 \pm 2,81\%$ ($p=0,763$).

As análises das IMF do fator de transcrição FOXP3 mostraram que este fator esteve expresso em quantidades equivalentes nas células dos animais controles e diabéticos, seja ele analisado na população de células T $CD4^+CD25^+$ ou T $CD4^+CD25^{hi}$ (Figura 43b). A IMF do Foxp3 expresso nas células T $CD4^+CD25^+$ do grupo controle foi de $145,24 \pm 59,66$ e de $128,26 \pm 37,29$ no grupo tratado com STZ ($p=0,590$). Com relação a população de células T $CD4^+CD25^{hi}$, aquelas que foram positivas para FOXP3 apresentaram IMF de $1304,19 \pm 880,11$ no grupo controle e de $955,66 \pm 350,76$ no grupo diabético ($p=0,399$).

A porcentagem de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras de IL-17 mostrou-se similar entre o grupo de animais controles e diabéticos (Figura 44), independente da condição de cultivo (basal ou ativado). No grupo controle, dentre os linfócitos T $CD3^+CD4^+$, $13,07 \pm 3,51\%$ dessas células produziram a citocina IL-17 em condições basais (sem estímulo), e no grupo de animais tratados com STZ essa porcentagem foi de $13,35 \pm 1,50\%$ ($p=0,864$). Quando os esplenócitos foram ativados com PMA e ionomicina, a porcentagem de células T $CD4^+$ produtoras de IL-17 foi de $19,55 \pm 1,13\%$ nos animais controles e de $18,95 \pm 3,07\%$ nos animais diabéticos ($p=0,727$). Com relação às células T $CD8^+$ cultivadas sem adição de estímulos, a porcentagem dessas células produtoras de IL-17 no baço dos animais controles

foi de $12,18 \pm 4,26\%$ e de $9,21 \pm 2,31\%$ no baço dos animais diabéticos ($p=0,221$). Após estimulação policlonal, a porcentagem de células T $CD8^+$ produtoras de IL-17 alterou para $14,54 \pm 1,04\%$ no grupo controle e de $17,18 \pm 2,85\%$ no grupo tratado com STZ ($p=0,119$).

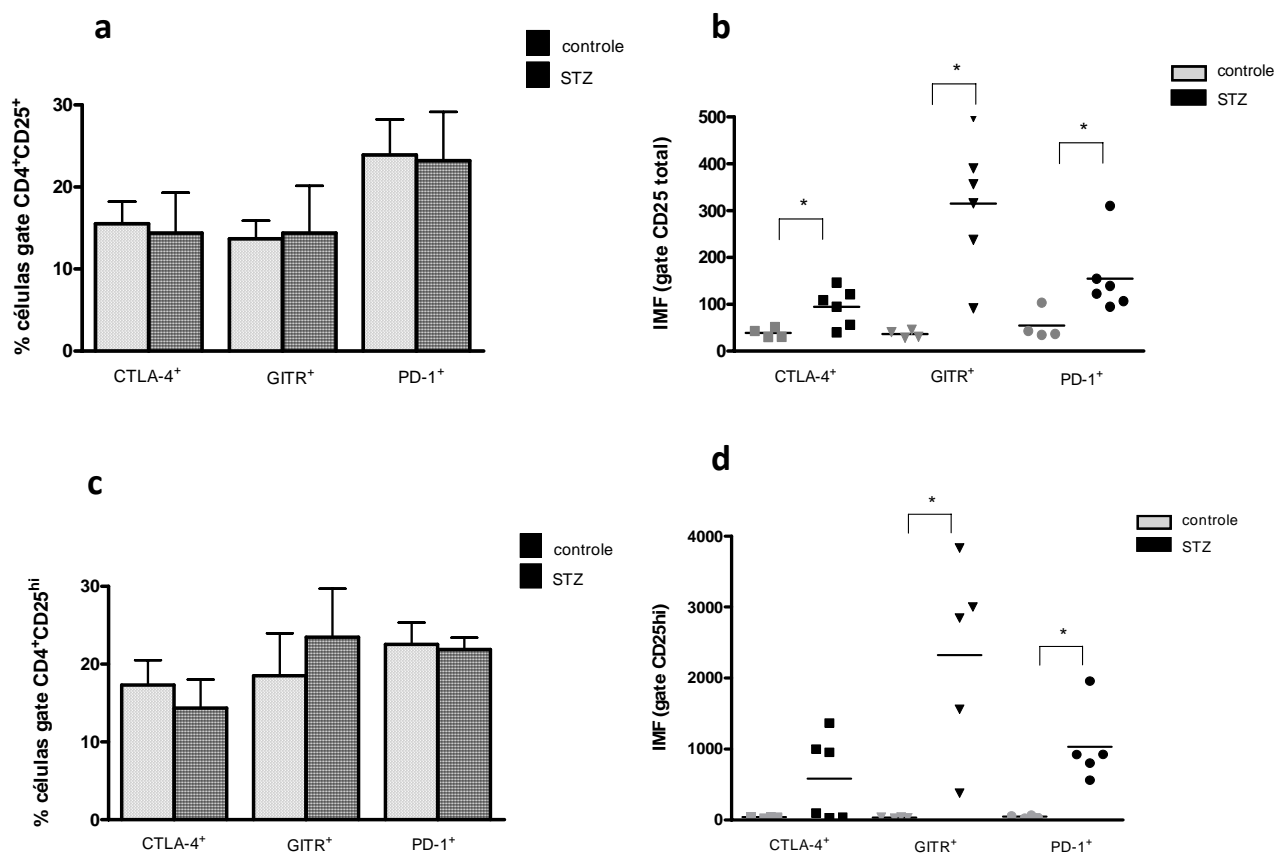


Figura 42. Análise da expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T $CD4^+CD25^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}$ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. Vinte e cinco dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) Porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 e (b) IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, ambas avaliadas na *gate* de células T $CD4^+CD25^+$. (c) Porcentagem de células positivas para CTLA-4, GITR e PD-1 e (d) IMF das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1, ambas avaliadas na *gate* de células T $CD4^+CD25^{hi}$. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. Nos gráficos de dispersão, cada ponto representa o valor da IMF de um indivíduo e os traços horizontais representam a média dos valores. (* $p<0,05$)

Tabela 14. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após a indução do diabetes.

| <i>Molécula</i> | <i>Controle (n=4)</i> <i>IMF</i> | <i>STZ (n=6)</i> <i>IMF</i> | <i>valor p</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| CTLA-4 | 38,90 ± 10,32 | 94,67 ± 40,14 | 0,028* |
| GITR | 36,30 ± 8,17 | 315,21 ± 139,67 | 0,004* |
| PD-1 | 54,66 ± 32,73 | 154,78 ± 79,19 | 0,046* |

Os valores estão representados pela média da IMF com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

Tabela 15. Intensidade média de fluorescência (IMF) das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 expressas na superfície das células T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após a indução do diabetes.

| <i>Molécula</i> | <i>Controle (n=4)</i> <i>IMF</i> | <i>STZ (n=6)</i> <i>IMF</i> | <i>valor p</i> |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| CTLA-4 | 40,13 ± 10,36 | 582,96 ± 592,45 | 0,110 |
| GITR | 35,94 ± 7,96 | 2322,86 ± 1357,09 | 0,012* |
| PD-1 | 47,99 ± 19,83 | 1033,12 ± 536,78 | 0,008* |

Os valores estão representados pela média da IMF com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

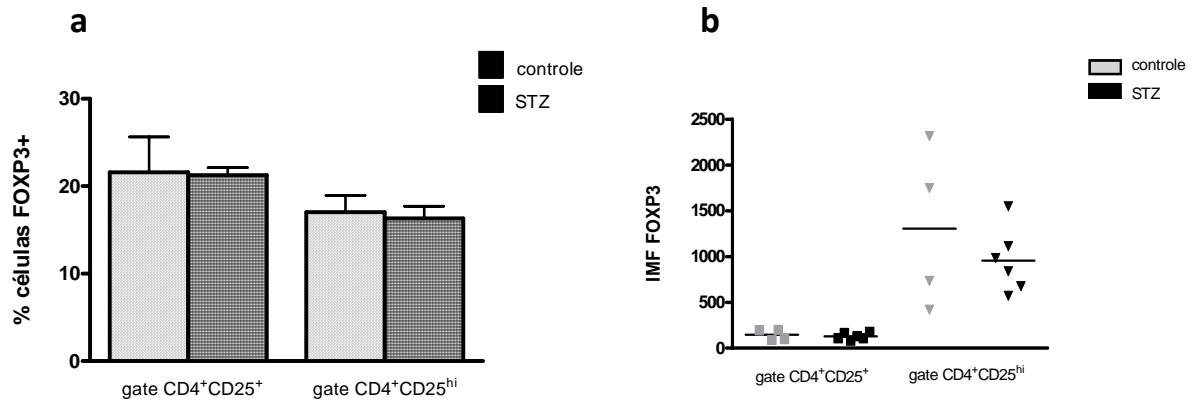


Figura 43. Análise da população de células T reguladoras Foxp3⁺ presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. Vinte e cinco dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada tanto na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺ quanto na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. (b) IMF do fator Foxp3 expresso nas células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço dos animais controles e tratados com STZ. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. No gráfico de dispersão, cada ponto representa o valor da IMF de um indivíduo e os traços horizontais representam a média dos valores. (* p<0,05)

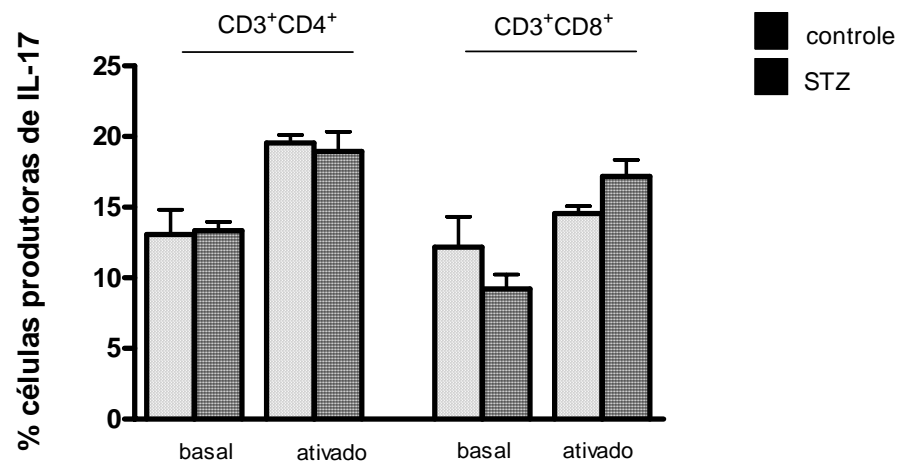


Figura 44. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-17 presentes no baço de animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. Vinte e cinco dias após tratamento com STZ/tampão citrato, o baço dos animais foi coletado e os esplenócitos isolados para imunofenotipagem, detecção de IL-17 intracelular e análise por FACS. A população de células produtoras de IL-17 foi avaliada em duas condições experimentais, sendo que na condição basal os esplenócitos foram cultivados na ausência de estímulos policlonais, e em condição de ativação eles foram cultivados por 5 horas na presença de PMA e ionomicina. A porcentagem de células produtoras de IL-17 foi avaliada tanto na *gate* de células CD3⁺CD4⁺ quanto na *gate* CD3⁺CD8⁺. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

c.2) Análises das populações celulares dos linfonodos pancreáticos

A porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes nos linfonodos pancreáticos mostrou-se semelhante em ambos os grupos de animais analisados (Figura 45a). No grupo controle, a porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ encontrada nos linfonodos foi de $2,36 \pm 0,16\%$ enquanto que no grupo de animais diabéticos esta porcentagem foi de $3,14 \pm 0,61\%$ ($p=0,168$). A porcentagem de células T CD4⁺CD25^{hi} detectada nos linfonodos pancreáticos dos animais controles foi de $1,23 \pm 0,41\%$ e nos animais tratados com STZ de $1,52 \pm 0,53\%$ ($p=0,422$).

A população de células T reguladoras (Foxp3⁺) mostrou-se levemente aumentada nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos em comparação aos animais controles (Figura 45b), no entanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$). A porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ positivas para o fator de transcrição Foxp3 nos linfonodos dos animais controles foi de $56,08 \pm 21,35\%$, enquanto que nos animais diabéticos essa porcentagem foi de $77,01 \pm 9,14\%$ ($p=0,209$). Com relação a população de células T CD4⁺CD25^{hi}, cerca de $61,77 \pm 13,64\%$ dessas células presentes nos linfonodos do grupo controle expressavam o Foxp3 e no grupo tratado com STZ essa porcentagem foi de $72,11 \pm 12,46\%$ ($p=0,274$).

Não foi possível observar diferenças significativas na população de linfócitos T produtores de IL-17, seja a produção da citocina avaliada na *gate* de células T CD3⁺CD4⁺ quanto nas células T CD3⁺CD8⁺ (Figura 46). A porcentagem de células T CD4⁺ que produziam IL-17 nos linfonodos drenantes dos animais controles foi de $15,59 \pm 1,88\%$ e nos animais diabéticos foi de $17,10 \pm 3,17\%$ ($p=0,490$). A porcentagem de células T CD8⁺ que produziam IL-17 encontrada nos linfonodos pancreáticos dos animais controles foi de $18,75 \pm 0,26\%$ e nos diabéticos de $17,44 \pm 3,32\%$ ($p=0,532$).

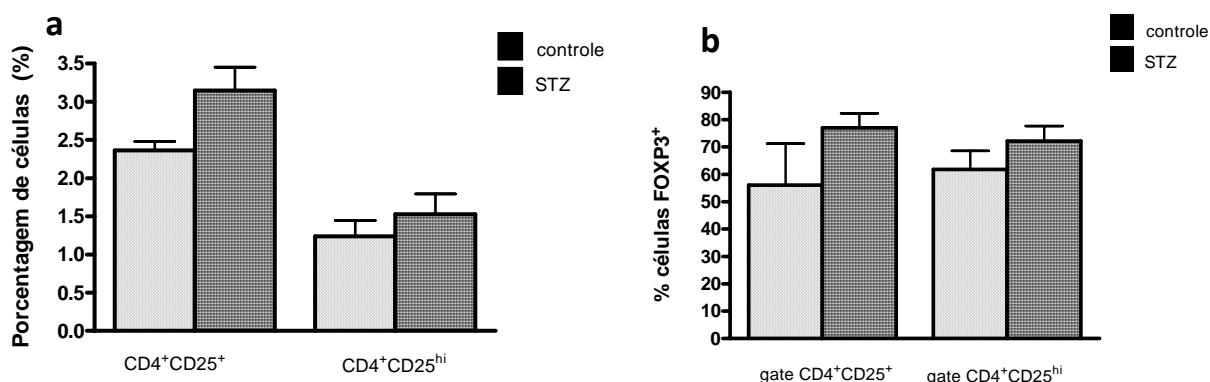


Figura 45. Análise da população de células T CD4⁺CD25⁺ e células T reguladoras Foxp3⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. Vinte e cinco dias após tratamento com STZ/tampão citrato, os linfonodos pancreáticos dos animais foram coletados e as células isoladas para imunofenotipagem e análise por FACS. (a) Porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25^{hi} presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com STZ. (b) A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada tanto na *gate* de células T CD4⁺CD25⁺, quanto na *gate* de células T CD4⁺CD25^{hi}. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

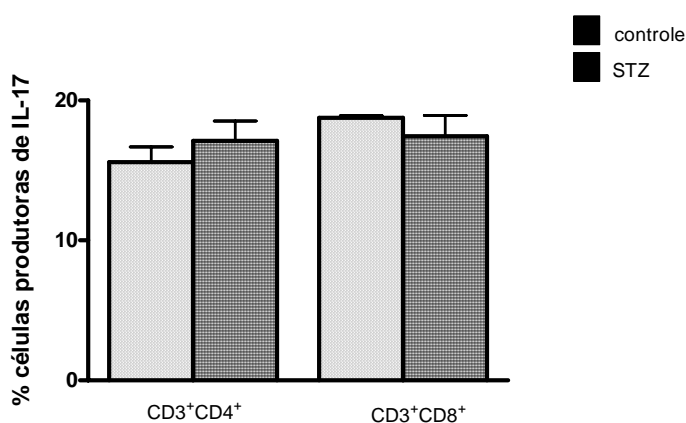


Figura 46. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-17⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. Vinte e cinco dias após tratamento com STZ/tampão citrato, os linfonodos pancreáticos dos animais foram coletados e as células isoladas para imunofenotipagem, detecção de IL-17 intracelular e análise por FACS. A população de células produtoras de IL-17 foi avaliada após cultivo na presença de PMA e ionomicina por 5h (ativação). A porcentagem de células produtoras de IL-17 foi avaliada tanto na *gate* de células CD3⁺CD4⁺ quanto na *gate* CD3⁺CD8⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,05)

d) Dosagem de citocinas presentes soro e homogenato pancreático de animais controles e tratados com STZ vinte e cinco dias após a indução do diabetes.

Com relação as citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-23, podemos observar através da Figura 47 que não houveram diferenças significativas na concentração dessas citocinas avaliadas no homogenato pancreático de ambos os grupos de animais estudados (Tabela 16). No entanto, observamos que a concentração da citocina IL-10 aumentou de maneira significativa no grupo de animais tratados com STZ ($15,52 \pm 3,84$ ng/g de tecido) em comparação com os animais controles ($8,59 \pm 1,21$ ng/g de tecido, $p=0,013$).

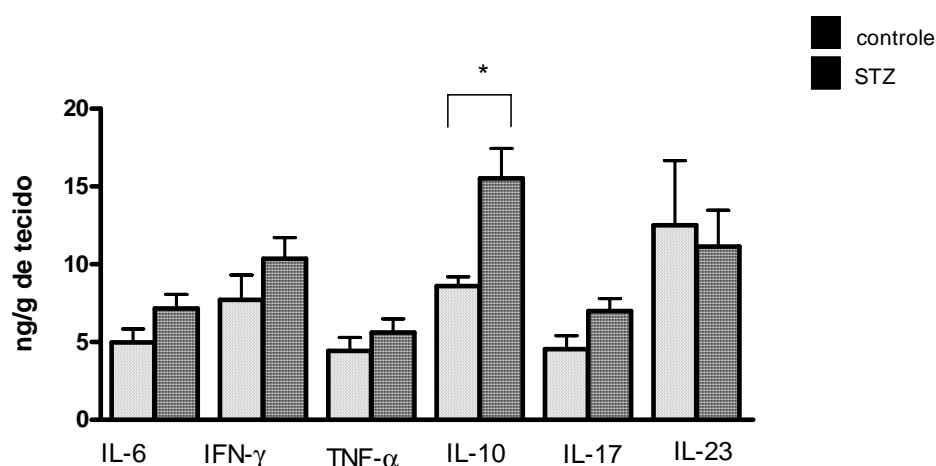


Figura 47. Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático dos animais controles e tratados com múltiplas doses de STZ vinte e cinco dias após indução do diabetes. Vinte e cinco dias após tratamento com STZ/tampão citrato, porções do pâncreas foram coletadas, homogeneizadas na presença de inibidor de proteases e a partir do homogenato pancreático as citocinas foram quantificadas através do ensaio de ELISA. A concentração das citocinas está representada por nanograma de citocina por grama de tecido pancreático. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. (* $p<0,05$)

Tabela 16. Concentrações das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17 e IL-23 presentes no homogenato pancreático de camundongos controles e diabéticos vinte e cinco dias após tratamento com STZ

| citocina | controle (n=4) ng/g tecido | STZ (n=6) ng/g tecido | valor p |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|---------|
| IL-6 | 4,97 \pm 2,28 | 7,16 \pm 2,38 | 0,105 |
| IFN- γ | 7,70 \pm 4,24 | 10,36 \pm 5,79 | 0,222 |
| TNF- α | 4,42 \pm 2,46 | 5,60 \pm 2,54 | 0,363 |
| IL-10 | 8,59 \pm 1,21 | 15,52 \pm 3,84 | 0,013* |
| IL-17 | 4,53 \pm 2,28 | 6,99 \pm 2,26 | 0,057 |
| IL-23 | 12,51 \pm 8,29 | 11,13 \pm 4,67 | 0,781 |

Valores representados como média \pm desvio padrão

* p<0,05



4. Resultados

Parte II

4.2. Avaliação do potencial terapêutico das MSCs humanas no diabetes experimental

Com a intenção de avaliarmos o potencial terapêutico das células mesenquimais estromais (MSCs) em reverterem o diabetes em camundongos tratados com STZ, estas células foram isoladas, cultivadas, expandidas, imunofenotipadas e por fim, infundidas nesses animais.

Desta forma, diabetes foi induzido em camundongos C57Bl/6 (8 semanas de idade) após administração de 5 doses diárias e consecutivas de STZ e posteriormente, os animais foram divididos em dois grupos distintos: um grupo para ser tratado com as MSCs (n=7) e um segundo grupo tratado com PBS (grupo controle, n=4).

As MSCs utilizadas nos transplantes foram obtidas de dois indivíduos normais saudáveis, sendo aqui referidas de amostras MSC1 e MSC2.

4.2.1. Estabelecimento das culturas de MSCs humanas derivadas de medula óssea

As MSCs humanas foram isoladas a partir de aspirado de medula óssea através de gradiente de Ficoll HypaqueTM e posteriormente foram cultivadas em meio de cultura α -MEM com 15% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas em garrafa de 75 cm² a 37°C com 5% de CO₂. Os repiques (passagens) foram feitos de acordo com a confluência exibida pela cultura e metade do meio de cultura trocado a cada três dias. Na terceira passagem, as MSCs humanas apresentaram como características marcantes a aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide típica deste tipo celular (Figura 48).

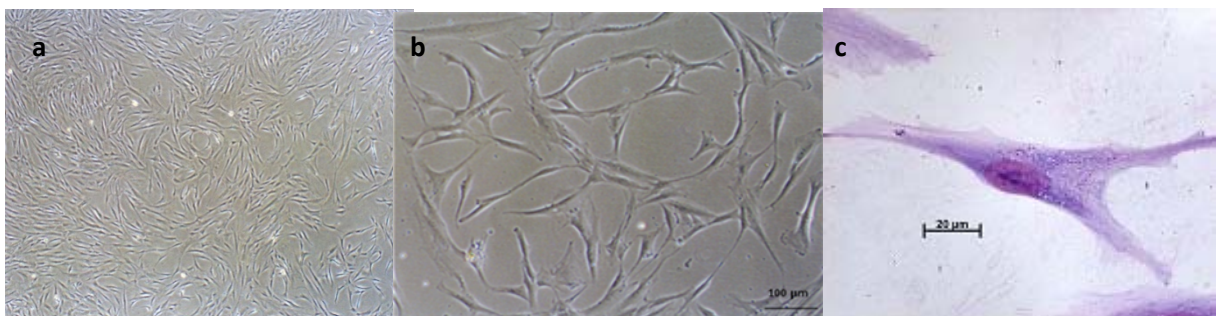


Figura 48. Aspecto morfológico das MSCs humanas cultivadas em terceira passagem. As MSCs foram isoladas a partir de aspirado de medula óssea de indivíduos saudáveis, separadas através de gradiente de Ficoll Hypaque, e cultivadas em meio de cultura α -MEM com 15% de soro bovino fetal. Na terceira passagem, as células apresentaram morfologia fibroblastóide típica de MSCs. (a) aumento 40x, (b) aumento 100x, (c) Coloração de Leishman, aumento 630x

4.2.2. Caracterização imunofenotípica das MSCs humanas derivadas na medula óssea

As MSCs (amostras MSC1 e MSC2) foram tripsinizadas na terceira passagem, marcadas com anticorpos monoclonais contra vários antígenos de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Os marcadores analisados na superfície das MSCs foram: CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD31, CD54, CD73, CD105, CD34, HLA-CLASSE I, HLA- CLASSE II, CD166, CD49e, CD146 e CD13.

Podemos observar através das Figuras 49 e 50 que os histogramas de ambas as amostras (MSC1 e MSC2) evidenciaram um imunofenótipo característico de MSCs: alta expressão de CD73, CD90, CD105, CD29, CD13, CD44 ,CD49e e CD166; expressão intermediária de CD54; HLA-CLASSE I , CD146, CD105 e expressão negativa de CD45, CD14, CD34, HLA-CLASSE II, CD51/61 e CD31.

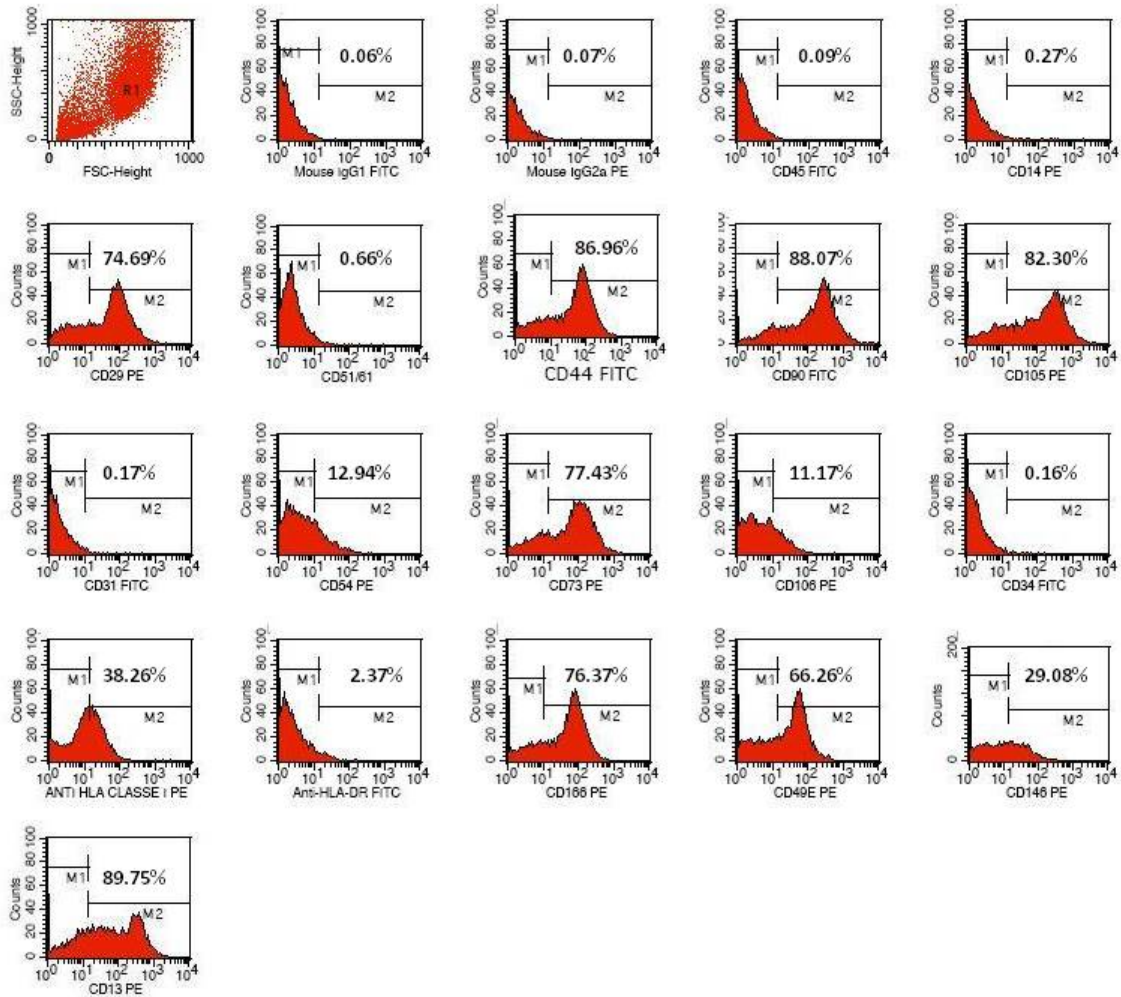


Figura 49. Caracterização imunofenotípica da amostra MSC1 isolada de medula óssea de indivíduo saudável. As MSCs foram isoladas a partir de aspirado de medula óssea de indivíduo saudável, separadas através de gradiente de Ficoll Hypaque, e cultivadas em meio de cultura α -MEM com 15% de soro bovino fetal. Na terceira passagem, as células foram tripsinizadas e marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos contra diversos antígenos de superfície expressos nas MSCs (CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD31, CD54, CD73, CD105, CD34, HLA-CLASSE I, HLA- CLASSE II, CD166, CD49e, CD146 e CD13). Para análise, foi desenhada uma *gate* na população de células viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Os eventos da *gate* de células viáveis (R1) foram representados por um histograma de fluorescência 1 (FL1, FITC - isotiocianato de fluoresceína) ou fluorescência 2 (FL2, PE - ficoeritrina). Os valores representam a porcentagem de células positivas para aquele determinado antígeno de superfície.

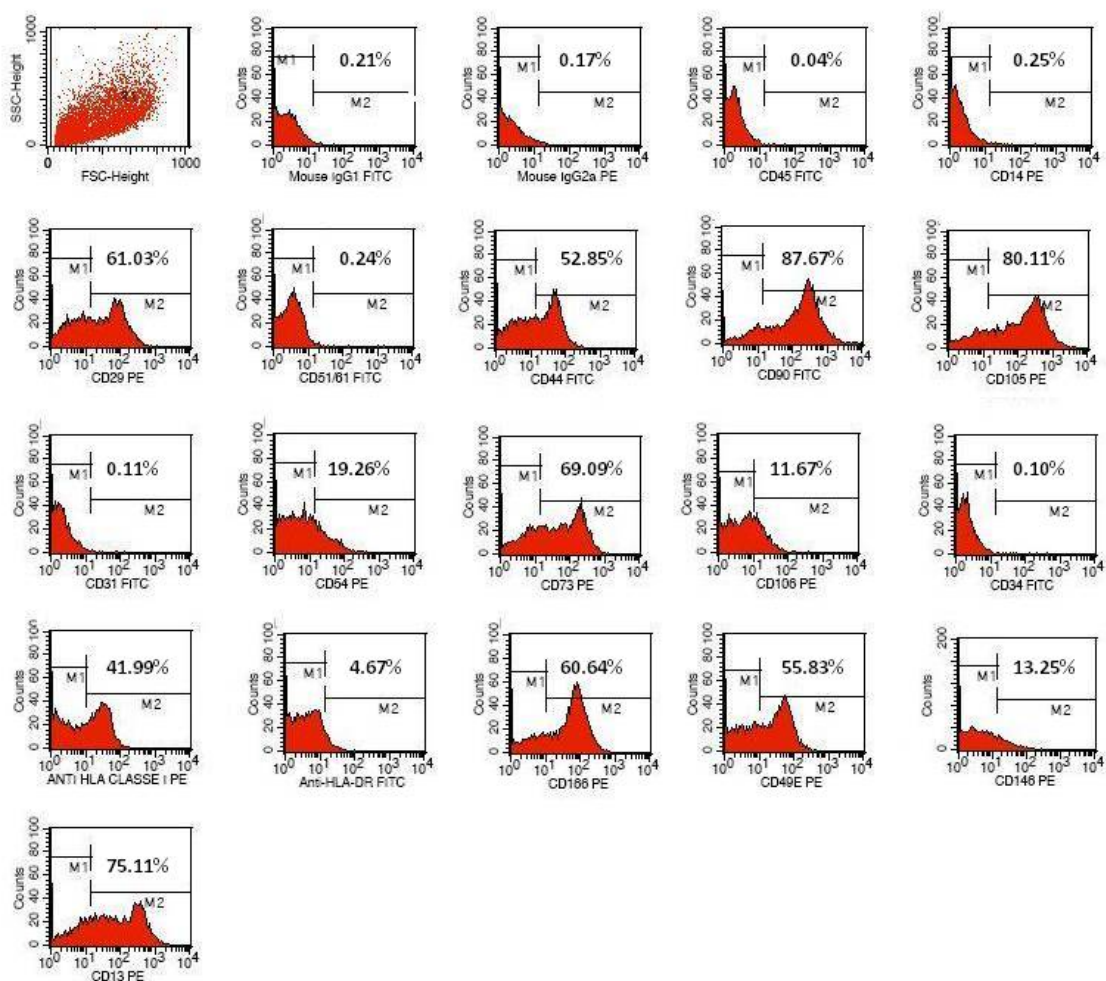


Figura 50. Caracterização imunofenotípica da amostra MSC2 isolada de medula óssea de indivíduo saudável. As MSCs foram isoladas a partir de aspirado de medula óssea de indivíduo saudável, separadas através de gradiente de Ficoll Hypaque, e cultivadas em meio de cultura α -MEM com 15% de soro bovino fetal. Na terceira passagem, as células foram tripsinizadas e marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos contra diversos antígenos de superfície expressos nas MSCs (CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD31, CD54, CD73, CD105, CD34, HLA-CLASSE I, HLA- CLASSE II, CD166, CD49e, CD146 e CD13). Para análise, foi desenhada uma *gate* na população de células viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Os eventos da *gate* de células viáveis (R1) foram representados por um histograma de fluorescência 1 (FL1, FITC - isotiocianato de fluoresceína) ou fluorescência 2 (FL2, PE - ficoeritrina). Os valores representam a porcentagem de células positivas para aquele determinado antígeno de superfície.

4.2.3. Avaliação do potencial de diferenciação das MSCs em adipócitos e osteócitos

Com a intenção de avaliarmos a multipotencialidade das MSCs, realizamos a diferenciação dessas células em adipócitos e osteócitos através de meios de cultura indutores específicos. Podemos observar na Figura 51 a diferenciação das MSC1 em adipócitos, onde foi possível detectar a presença de gotículas de lipídeos no citoplasma das células através da coloração de Sudan II. Já a diferenciação em osteócitos pode ser evidenciada através de depósitos de cálcio corados pela coloração de von Kossa. Resultados semelhantes foram observados para a amostra MSC2.

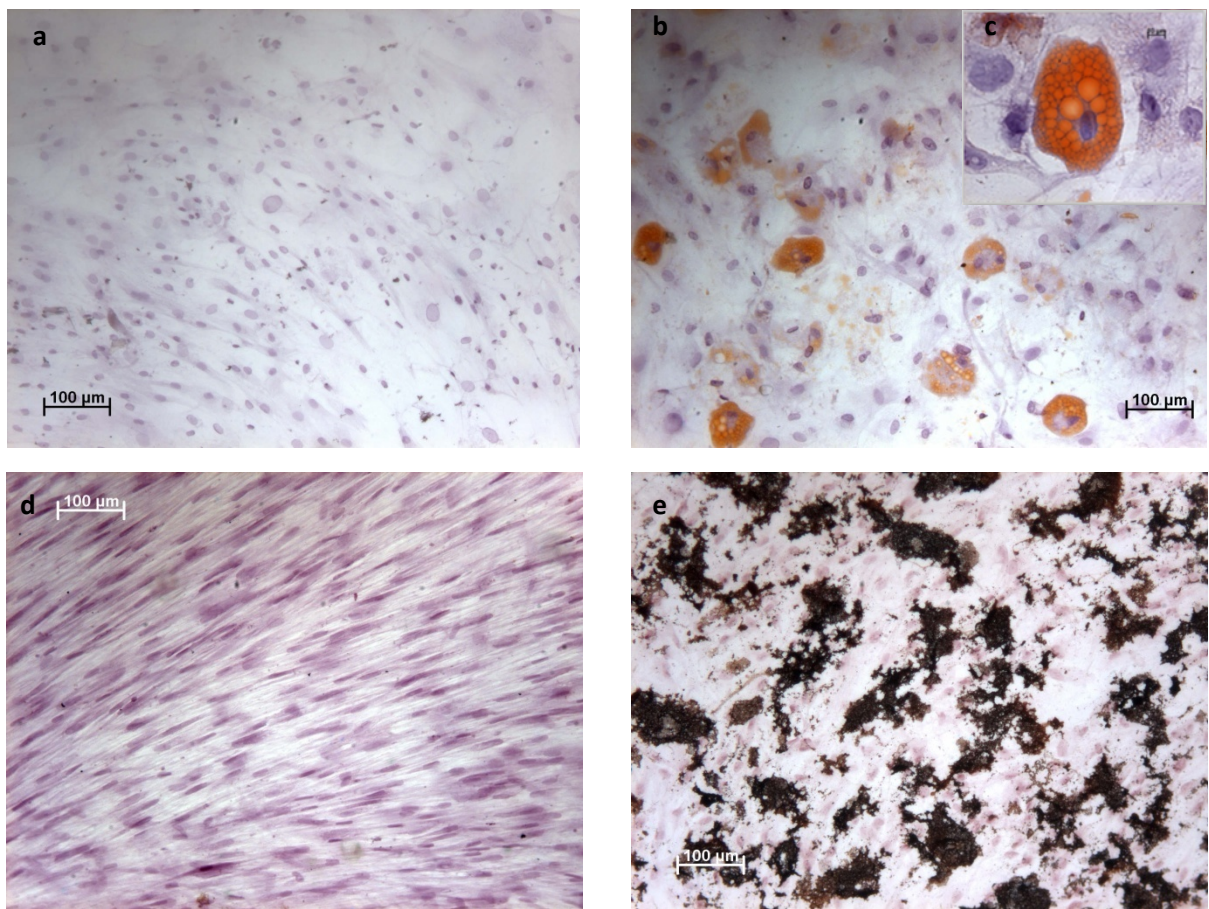


Figura 51. Diferenciação adipogênica e osteocítica das células mesenquimais da amostra MCS1. (a) MSC cultivada em meio de cultura controle, corada com Sudan II, aumento 100x, (b,c) MSC cultivada em meio indutor de adipogênese, exibindo gotículas de lipídeos no citoplasma das células coradas com Sudan II, aumento 100 e 630x, respectivamente, (d) MSC cultivada na presença de meio de cultura controle, coloração de von Kossa, aumento 100x, (e) MSC cultivada na presença de meio indutor de osteogênese, exibindo depósitos de cálcio evidenciados através da coloração de Von Kossa, aumento 100x.

4.2.4. Transplante das MSCs humanas em camundongos C57BL/6 diabéticos

Após imunofenotipagem e caracterização da multipotencialidade das MSCs, foram realizadas duas infusões de MSCs nos animais tratados com STZ via plexo orbital, sendo que o período de tempo entre um transplante e outro foi de sete dias. A primeira infusão foi feita 21 dias após a última dose de STZ e foram injetadas em cada animal $0,5 \times 10^6$ células da amostra MSC1. A segunda infusão foi realizada sete dias depois, ou seja, 28 dias após a última dose de STZ, e foram administradas 1×10^6 células /animal da amostra MSC2. As médias das glicemias dos animais que receberam as MSCs (n=7) nestes períodos estão listadas na Tabela 17. O grupo controle recebeu as múltiplas doses de STZ e no momento dos transplantes eles receberam apenas infusões de PBS+Pulmozyme (n=4).

Tabela 17. Glicemia dos camundongos (mg/dl) tratados com STZ que receberam as infusões de MSCs (n=7) no período de 21 dias após tratamento com STZ (primeira infusão) e 28 dias após STZ (segunda infusão).

| Camundongo | 21 dias após STZ | 28 dias após STZ |
|------------|------------------|------------------|
| 1 | 417 | 383 |
| 2 | 369 | 388 |
| 3 | 505 | 383 |
| 4 | 457 | 348 |
| 5 | 511 | 426 |
| 6 | 307 | 411 |
| 7 | 335 | 411 |

4.2.4.1. Avaliação das taxas glicêmicas dos camundongos após infusão MSCs humanas

As taxas glicêmicas dos animais foram monitoradas periodicamente, sendo que estas foram medidas pela manhã, na ausência de jejum. De acordo com as Figuras 52 e 53 podemos observar que nem todos os animais que receberam as infusões de MSCs responderam ao tratamento. Do total de sete animais que receberam as MSCs, cinco animais (71,42%) foram capazes de reverter a hiperglicemia durante o intervalo de tempo analisado (animais respondedores) e dois animais mantiveram altas taxas de glicose no sangue (28,58%, animais não respondedores).

Com relação aos animais respondedores, podemos observar através da Tabela 18, que a hiperglicemia foi diminuindo aos poucos, com muitas variações ao longo do tempo e só alcançou valores considerados normais quatro meses após a última infusão (120 dias). Por outro lado, os animais não respondedores não foram capazes de apresentar níveis normais de glicemia, mantendo-se hiperglicêmicos em todos os períodos analisados (Tabela 19).

Podemos notar através da Figura 54 que quatro meses após o segundo transplante, foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,001$) na glicemia dos animais respondedores em comparação com os animais não respondedores e diabéticos. Por outro lado, não foi possível observar diferenças significativas entre a glicemia do grupo controle em relação a dos animais não respondedores ($p = 0,174$). No final do período analisado, os animais respondedores apresentaram média de glicemia de $136,20 \pm 14,80$ mg/dl, para os animais não respondedores essa média foi de $340,00 \pm 38,18$ mg/dl e no grupo controle tratado somente com PSB de $379,22 \pm 25,63$ mg/dl (Tabela 20).

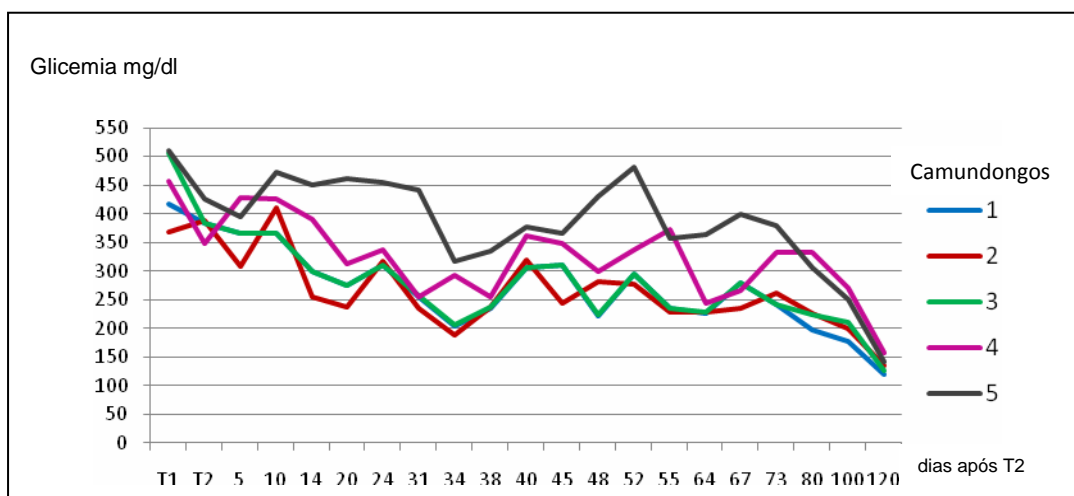


Figura 52. Evolução das taxas glicêmicas dos animais que responderam ao tratamento com as MSCs (respondedores). Os animais recebem a primeira infusão de MSCs ($0,5 \times 10^6$ células) 21 dias após a indução do diabetes e a segunda infusão (1×10^6 células) foi realizada sete dias depois (28 dias após indução). Cada linha representa a evolução da glicemia de um indivíduo ao longo do tempo, sendo esta representada por mg de glicose por dl de sangue (mg/dl). (T1: momento do primeiro transplante, T2: segundo transplante).

Tabela 18. Evolução da glicemia (mg/dl) dos animais que responderam ao tratamento com MSCs (respondedores, n=5).

| Dias após segundo transplante | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5 | 365 | 309 | 365 | 429 | 396 |
| 10 | 366 | 411 | 366 | 427 | 473 |
| 14 | 299 | 256 | 299 | 390 | 452 |
| 20 | 275 | 237 | 275 | 312 | 462 |
| 24 | 310 | 318 | 310 | 337 | 456 |
| 31 | 256 | 236 | 256 | 256 | 443 |
| 34 | 205 | 189 | 205 | 293 | 318 |
| 38 | 236 | 238 | 236 | 256 | 336 |
| 40 | 306 | 320 | 306 | 362 | 378 |
| 45 | 311 | 245 | 311 | 349 | 366 |
| 48 | 223 | 281 | 223 | 300 | 432 |
| 52 | 295 | 278 | 295 | 337 | 483 |
| 55 | 235 | 229 | 235 | 372 | 358 |
| 64 | 227 | 228 | 227 | 245 | 364 |
| 67 | 279 | 236 | 279 | 267 | 399 |
| 73 | 242 | 262 | 242 | 333 | 379 |
| 90 | 198 | 226 | 223 | 333 | 306 |
| 100 | 177 | 200 | 211 | 270 | 251 |
| 120 | 120 | 135 | 126 | 158 | 142 |

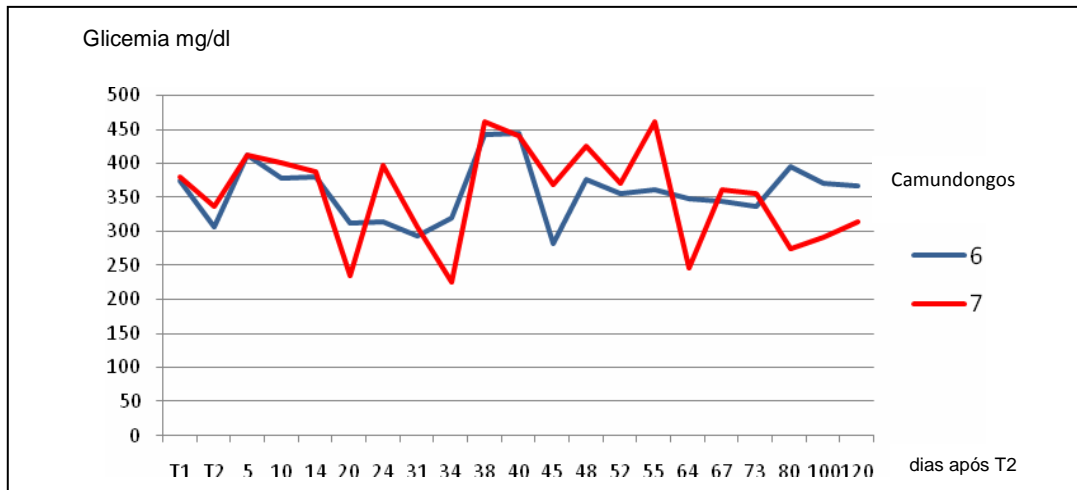


Figura 53. Evolução das taxas glicêmicas dos animais que não responderam ao tratamento com as MSCs (não respondedores). Os animais recebem a primeira infusão de MSCs ($0,5 \times 10^6$ células) 21 dias após a indução do diabetes e a segunda infusão (1×10^6 células) foi realizada sete dias depois (28 dias após indução). Cada linha representa a evolução da glicemia de um indivíduo ao longo do tempo, sendo esta representada por mg de glicose por dl de sangue (mg/dl). (T1: momento do primeiro transplante, T2: segundo transplante)

Tabela 19. Evolução da glicemia (mg/dl) dos animais que não responderam ao tratamento com MSCs (não respondedores, n=2).

| Dias após segundo transplante | 6 | 7 |
|-------------------------------|-----|-----|
| 5 | 411 | 411 |
| 10 | 378 | 399 |
| 14 | 379 | 387 |
| 20 | 312 | 234 |
| 24 | 313 | 396 |
| 31 | 293 | 305 |
| 34 | 319 | 225 |
| 38 | 442 | 460 |
| 40 | 443 | 440 |
| 45 | 282 | 367 |
| 48 | 376 | 425 |
| 52 | 355 | 370 |
| 55 | 360 | 460 |
| 64 | 347 | 286 |
| 67 | 343 | 360 |
| 73 | 337 | 355 |
| 90 | 394 | 273 |
| 100 | 370 | 290 |
| 120 | 367 | 313 |

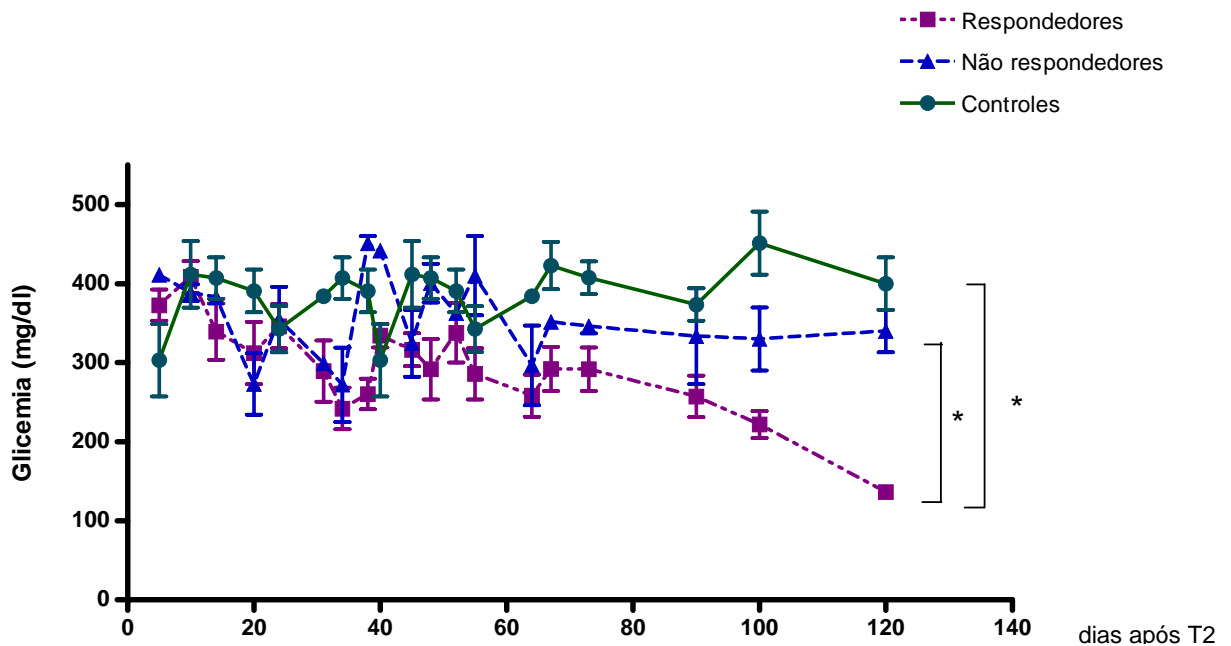


Figura 54. Evolução da glicemia (mg/dl) dos animais diabéticos tratados ou não com MSCs. A glicemia dos animais foi monitorada periodicamente, pela manhã, na ausência de jejum. Cento e vinte dias após o segundo transplante (T2), os animais que responderam à terapia com as MSCs (animais respondedores, n=5) apresentaram níveis de glicose no sangue inferiores aos observados nos animais que não responderam à terapia com as MSCs (animais não respondedores, n=2) e aos animais controles (diabéticos que receberam duas infusões de PBS, n=4). Cada ponto no gráfico representa a média da glicemia de um determinado grupo de animais, em um dado período de tempo, com o respectivo desvio padrão. (* p<0,001).

Tabela 20. Glicemia dos camundongos tratados com STZ 120 dias após a segunda infusão de MSCs ou PBS.

| Grupo | 120 dias após segunda infusão |
|-------------------------|-------------------------------|
| Controle (n=4) | 379,22 ± 25,63 |
| Respondedores (n=5) | 136,20 ± 14,80 |
| Não respondedores (n=2) | 340,00 ± 38,18 |

Os valores estão representados pela média ± desvio padrão

4.2.4.2. Teste tolerância a glicose

Com a finalidade de avaliarmos indiretamente os níveis de insulina circulante nos animais que receberam ou não o transplante das MSCs, realizamos um teste de tolerância a glicose 115 dias após segundo transplante. Desta forma, quatro grupos de animais foram analisados: grupo de animais WT (selvagem, n=2), grupo de animais tratados com STZ e que receberam as injeções de PBS (diabéticos, n=2), grupo de animais respondedores à terapia com MSCs (n=3) e o grupo dos animais que não responderam à terapia (n=2). Após jejum de 10 horas, foi administrado na cavidade peritoneal 1,5 mg/g de glicose diluída em salina e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após (Figura 55).

Antes da administração da glicose, os animais WT apresentaram glicemia de $112,5 \pm 13,4$ mg/dl, quinze minutos após injeção de glicose a glicemia subiu para $194,5 \pm 2,12$ mg/dl e ao final de três horas a glicemia apresentava valores semelhantes ao do início do teste ($86 \pm 25,45$ mg/dl). Os animais diabéticos, tratados somente com PBS, apresentaram glicemia de $341 \pm 93,33$ mg/dl no início do teste, quinze minutos após administração da glicose a glicemia foi para $521,5 \pm 61,51$ mg/dl e após três horas os animais apresentaram glicemia maior do que no início dos teste ($539,5 \pm 17,67$ mg/dl). Já os animais tratados com STZ que responderam ao transplante das MSCs (animais respondedores) foram capazes de retornar a níveis de glicose sanguínea semelhantes ao início do teste. Esses animais começaram o teste com uma glicemia de $163,6 \pm 26,80$ mg/dl, após quinze minutos a glicemia subiu para $426,6 \pm 13,6$ mg/dl e após 180 minutos a glicemia se restabeleceu em $146,6 \pm 27,0$ mg/dl. Por outro lado, os animais não respondedores apresentaram a curva de glicemia semelhante aos animais diabéticos. No início do teste (jejum), a glicemia dos animais estava em torno de $379,5 \pm 27,5$ mg/dl, quinze minutos após administração da solução de glicose o nível de glicose no sangue subiu para $529,0 \pm 41,0$ mg/dl e ao final das três horas a glicemia foi de $422,5 \pm 19,0$ mg/dl (Tabela 21).

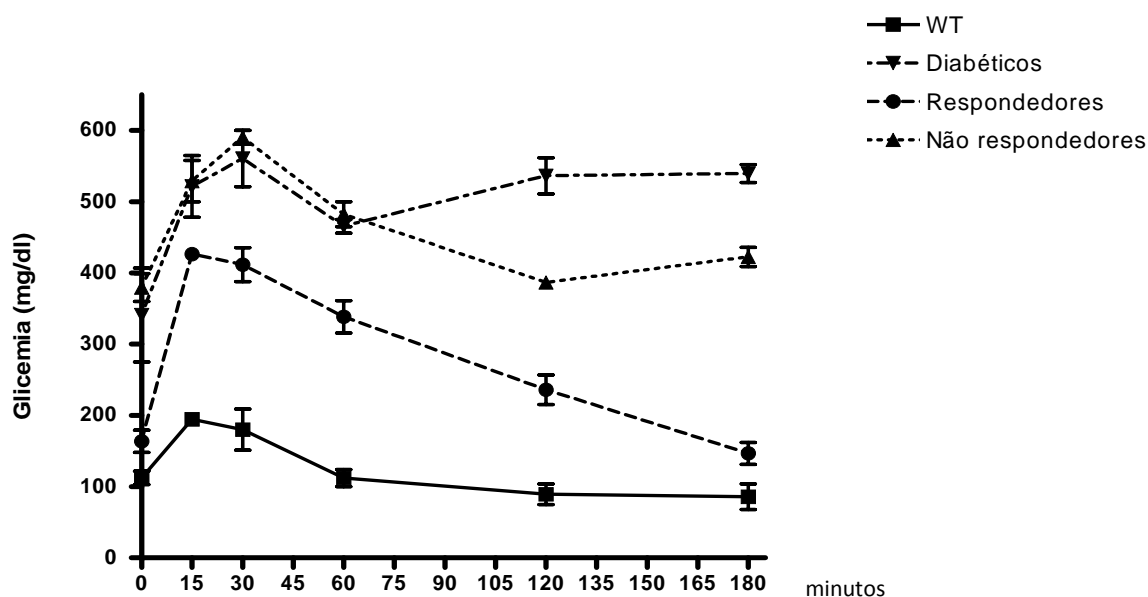


Figura 55. Teste de tolerância a glicose. Após jejum de 10 horas, foi administrado na cavidade peritoneal dos animais 1,5 mg/g de glicose diluída em salina e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após. Os animais WT (camundongos C57/Bl6 selvagem), diabéticos (animais que receberam as múltiplas doses de STZ e duas doses de PBS), respondedores (animais que receberam as múltiplas doses de STZ e que responderam à terapia com MSCs) e não respondedores (animais que receberam as múltiplas doses de STZ e que não responderam à terapia com MSCs) foram avaliados 115 dias após a última infusão PBS ou MSCs. Cada ponto no gráfico representa a média da glicemia (mg/dl) de um determinado grupo de animais com o respectivo desvio padrão.

Tabela 21. Evolução das taxas glicêmicas dos animais durante o teste de tolerância a glicose.

| | antes | 15' | 30' | 60' | 120' | 180' |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| WT | 112,5 ± 13,4 | 194,5 ± 2,1 | 180 ± 41,0 | 112,0 ± 16,9 | 89,5 ± 20,5 | 86,0 ± 25,4 |
| Diabéticos | 341,0 ± 93,3 | 521,5 ± 61,5 | 560,5 ± 55,8 | 465,5 ± 36,0 | 536,5 ± 36,0 | 539,5 ± 17,6 |
| Respondedores | 163,6 ± 26,8 | 426,6 ± 13,6 | 411,6 ± 41,5 | 338,3 ± 35,6 | 236 ± 35,6 | 146,6 ± 27,0 |
| Não respondedores | 379,5 ± 27,5 | 529,0 ± 41,0 | 590,5 ± 13,4 | 482,5 ± 24,7 | 386,5 ± 10,6 | 422,5 ± 19,0 |

Após jejum de 10 horas, foi administrado na cavidade peritoneal dos animais 1,5 mg/g de glicose diluída em salina e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após.

4.2.4.3. Análises histológicas do pâncreas dos animais tratados ou não tratados com MSCs.

Com a intenção de avaliarmos a morfologia e densidade das ilhotas pancreáticas dos animais diabéticos que receberam ou não os transplantes com MSCs, realizamos análises histológicas de porções do pâncreas através da coloração de hematoxilina e eosina. Podemos observar na Figura 56 que os animais que receberam e responderam ao tratamento com MSCs apresentaram ilhotas pancreáticas maiores, mais numerosas e com morfologia típica em comparação aos animais que receberam apenas infusões PBS (animais diabéticos).

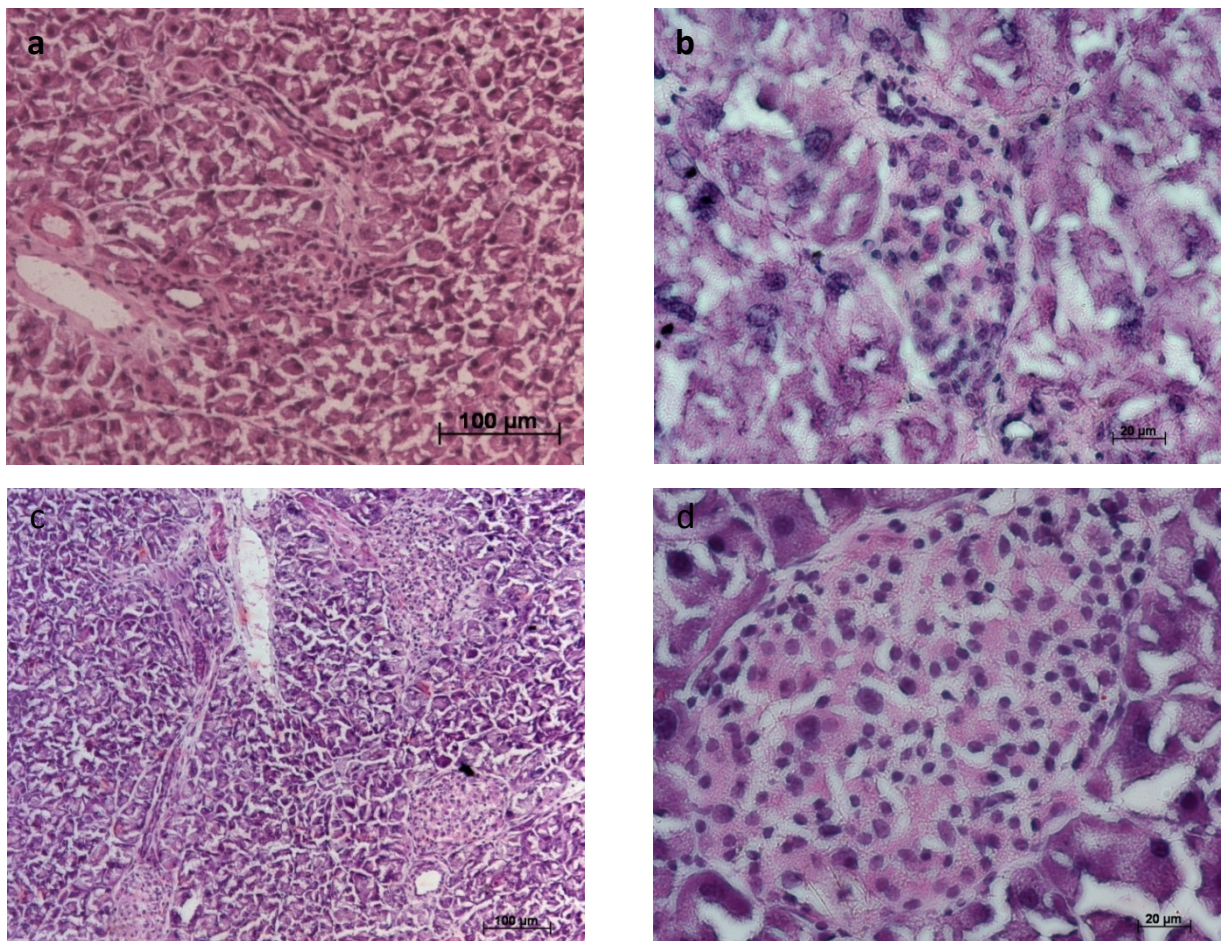


Figura 56. Análises histológicas do pâncreas dos animais tratados ou não com MSCs. Cento e vinte dias após a segunda infusão de MSCs/PBS, o pâncreas dos animais foi coletado, incluído em parafina, cortado a 5 μ m, corado com hematoxilina-eosina e visualizado em microscópio óptico. (a,b) Ilhotas pancreáticas de animais diabéticos que receberam duas injeções contendo somente PBS, aumento 100 e 400x, respectivamente; (c,d) Ilhotas pancreáticas de animais diabéticos que responderam ao tratamento com MSCs, aumento 100 e 400x, respectivamente.

4.2.4.4. Avaliação da massa de células beta produtoras de insulina

Uma vez que observamos reversão da hiperglicemia na maioria dos animais que receberam as MSCs (71,42%) e paralelamente um aumento de tamanho e densidade das ilhotas pancreáticas nestes animais, o próximo passo foi avaliar uma possível regeneração de células beta promovida pela terapia com MSCs. Desta forma, foram feitas análises de imunofluorescência para detectar as células produtoras de insulina em segmentos do pâncreas de animais selvagens (WT), animais diabéticos (receberam apenas injeções contendo PBS), animais respondedores ao transplante das MSCs e animais não respondedores ao transplante.

Podemos observar através das Figuras 57a e 57b que nos animais WT a marcação para insulina (vermelho) foi bem extensa e evidente, sugerindo a presença de grande quantidade de células beta produtoras de insulina. Por outro lado, ao analisarmos a marcação nos animais que receberam as múltiplas doses de STZ e as infusões contendo somente PBS (animais diabéticos), poucas células produtoras de insulina foram detectadas, ou seja, poucas regiões de marcação positiva para insulina foram observadas, sugerindo uma ampla destruição desse tipo celular nas ilhotas pancreáticas (Figuras 57c e 57b). Em contraste, os animais que responderam à terapia com MSCs (animais respondedores) exibiram extensas áreas positivamente marcadas, sugerindo a presença de uma massa de células beta produtoras de insulina, muito semelhante, embora um pouco menos densa, aos animais selvagens (Figuras 58a e 58b). Aqueles animais que não responderam aos transplantes (animais não respondedores) apresentaram um perfil de marcação muito semelhante aos animais diabéticos, nos quais foi possível observar pouca marcação para insulina, sugerindo escassez das células produtoras de insulina (Figuras 58c e 58d).

Através da quantificação da área marcada (positiva) para insulina, observamos diferenças significativas na quantidade de insulina presente nas ilhotas dos animais que não receberam o tratamento com MSCs (diabéticos) em comparação com os animais tratados com MSCs (Tabela 22). Observamos diferenças significativas ($p < 0,05$) na porcentagem de marcação nas ilhotas dos animais WT e respondedores em comparação aos animais que não receberam o tratamento com MSC (diabéticos).

Tabela 22. Quantificação da área positiva para insulina nas ilhotas pancreáticas.

| animais | % área marcada (insulina) |
|-------------------|----------------------------------|
| WT | 61,55 ± 13,42 |
| Diabéticos (PBS) | 24,54 ± 5,10 |
| Respondedores | 60,36 ± 7,59 |
| Não respondedores | 40,25 ± 0,70 |

A marcação positiva (vermelha) foi quantificada pelo Software ImajeJ. Neste programa, a área total da ilhota é delimitada e a marcação positiva é quantificada nessa região. Os valores estão representados como média da porcentagem de marcação ± desvio padrão.

4.2.4.5. Avaliação da massa de células alfa produtoras de glucagon

Analizamos também a massa de células alfa produtoras de glucagon em todos os grupos de animais, uma vez que é sabido que durante a progressão da destruição das células beta pancreáticas há um aumento das células alfa como forma de substituição daquele tipo celular que foi perdido. Através das Figuras 59a e 59b podemos observar que no animal WT as células produtoras de glucagon se localizam na periferia das ilhotas e com a evolução do diabetes (animais diabéticos) essas células passam a ocupar o interior da ilhota, alterando desta forma seu padrão de distribuição (Figuras 59c e 59d). No entanto, os animais que receberam as MSCs e responderam a essa terapia exibiram um padrão de distribuição das células alfa muito semelhante aos animais WT, nos quais estas células localizaram-se, preferencialmente, na região periférica da ilhota (Figuras 60a e 60b). Por outro lado, aqueles animais que não responderam a terapia, essas células produtoras de glucagon apareceram desorganizadas, distribuídas por toda a ilhota, assemelhando-se aos animais diabéticos que foram tratados somente com PBS (Figuras 60c e 60d).

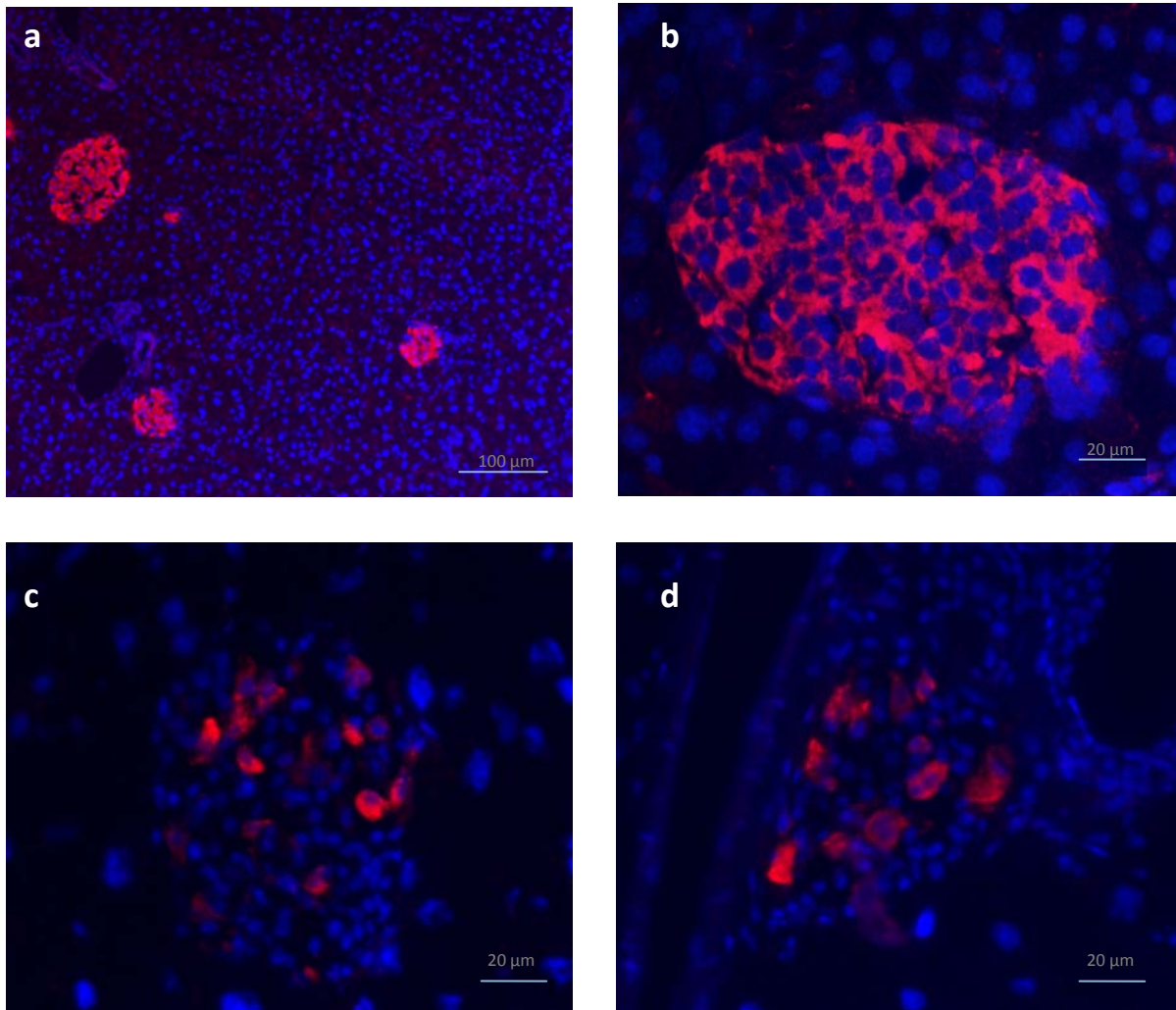


Figura 57. Avaliação da massa de células beta produtoras de insulina de camundongos WT e diabéticos. O pâncreas dos animais foi coletado, congelado e cortado para realização da técnica de imunofluorescência. Foi utilizado um anticorpo rabbit anti-mouse anti-insulina (vermelho) e os núcleos foram corados com DAPI (azul). (a,b) Ilhotas pancreáticas de camundongos WT (selvagem) exibindo extensa marcação para insulina, refletindo a presença de grande massa de células beta produtoras de insulina, aumento de 100 e 400x, respectivamente. (c,d) Ilhotas pancreáticas de camundongos que receberam as múltiplas doses de STZ e duas infusões de PBS (animais diabéticos) exibindo pouca marcação para insulina como resultado da destruição intensa das células beta, aumento de 400x.

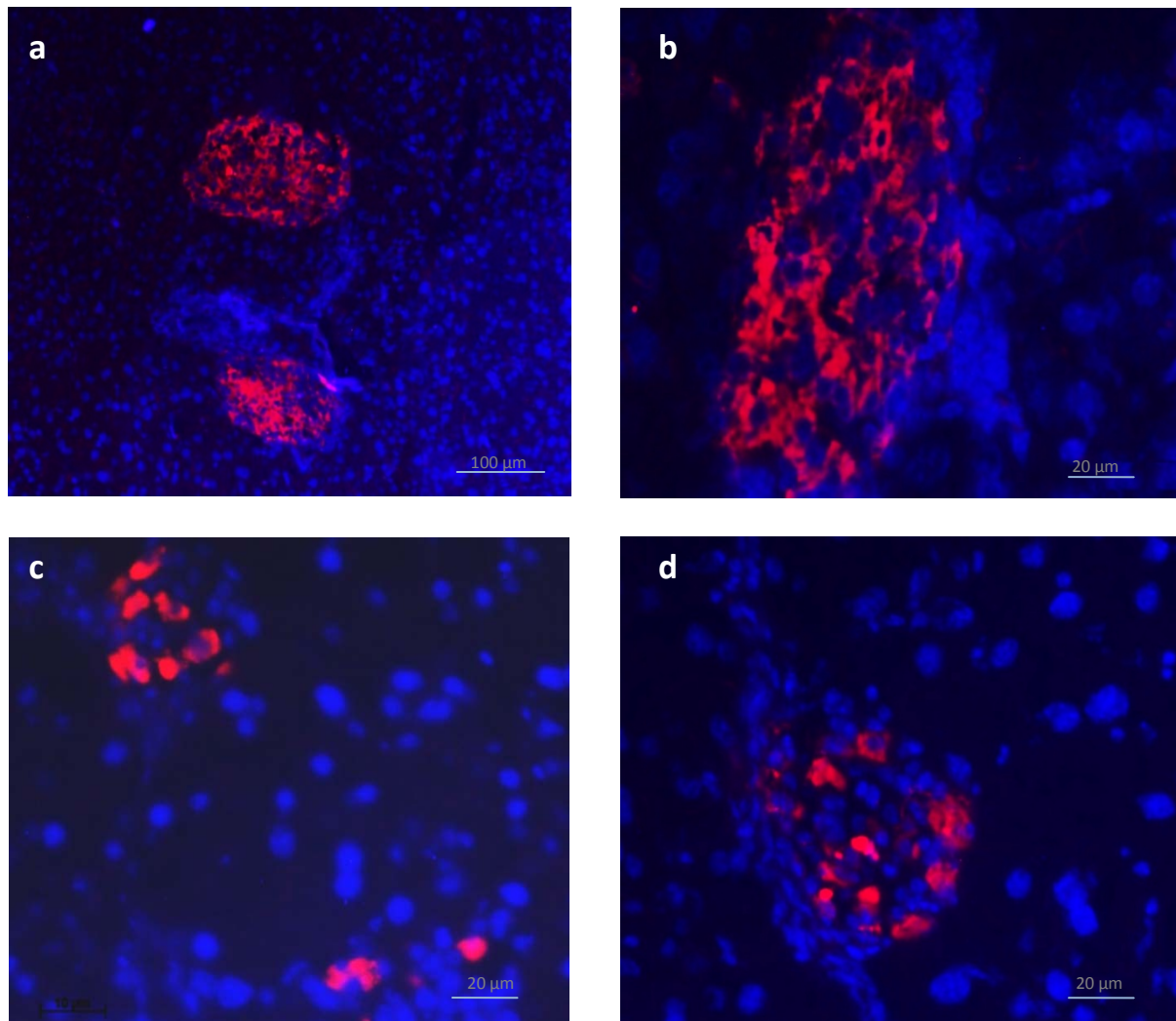


Figura 58. Avaliação da massa de células beta produtoras de insulina de camundongos respondedores e não respondedores à terapia com MSCs. Cento e vinte dias após a segunda infusão de MSCs, o pâncreas dos animais foi coletado, congelado e cortado para realização da técnica de imunofluorescência. Foi utilizado um anticorpo rabbit anti-mouse anti-insulina (vermelho) e os núcleos foram corados com DAPI (azul). (a,b) Ilhotas pancreáticas de camundongos que responderam ao tratamento com MSCs (animais respondedores) exibindo grande massa de células beta produtoras de insulina provavelmente regenerada pelas MSCs, aumento de 100 e 400x, respectivamente. (c,d) Ilhotas pancreáticas de camundongos que não responderam ao tratamento com MSCs (animais não respondedores) exibindo pouca marcação para insulina como resultado da destruição intensa das células beta, e ausência de regeneração induzida pelas MSCs, aumento de 400x.

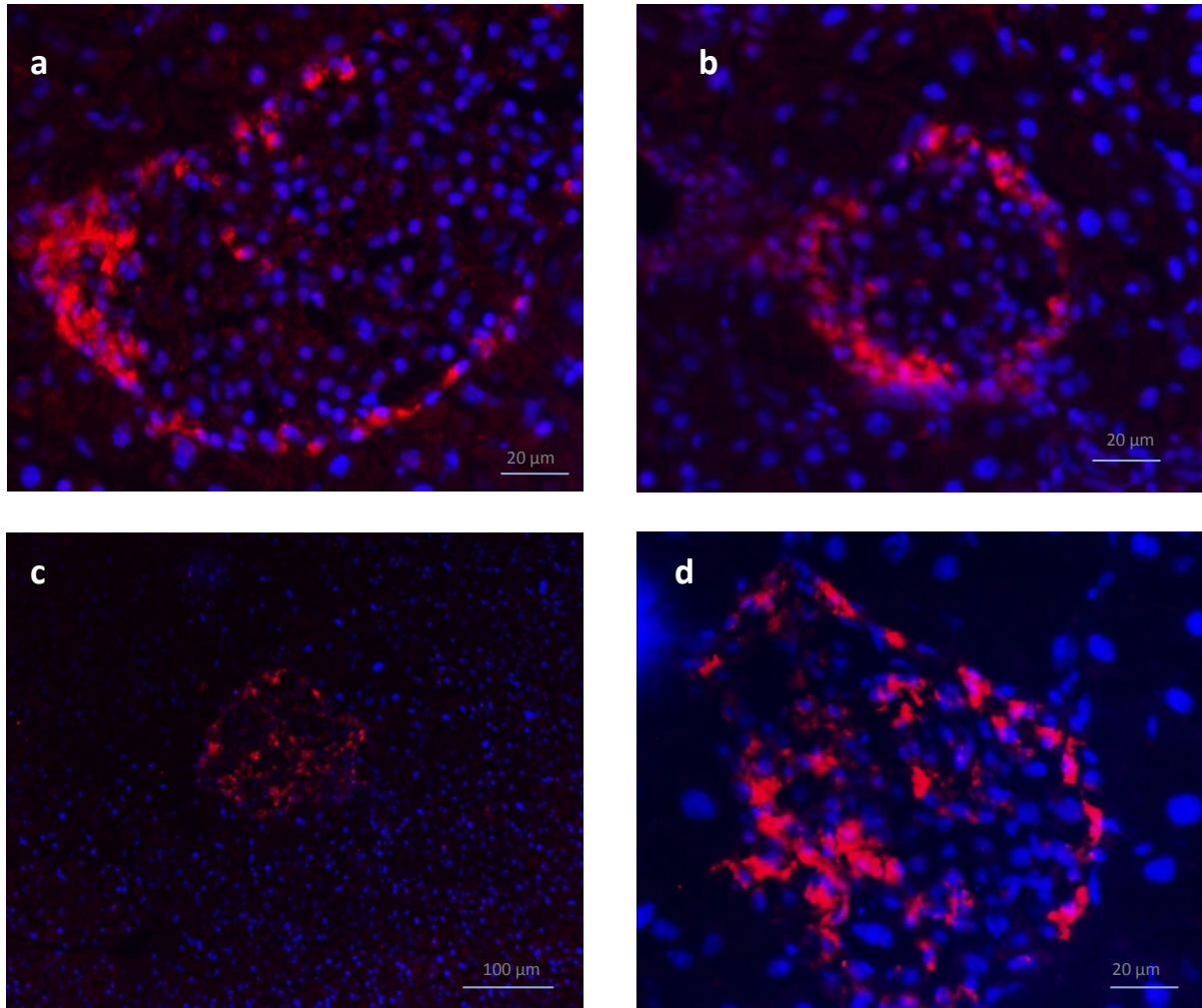


Figura 59. Avaliação da massa de células alfa produtoras de glucagon de camundongos WT e diabéticos. O pâncreas dos animais foi coletado, congelado e cortado para realização da técnica de imunofluorescência. Foi utilizado um anticorpo rabbit anti-mouse anti-glucagon (vermelho), os núcleos foram corados com DAPI (azul) e visualizados sob microscópio de fluorescência. (a,b) Ilhota pancreática de camundongos WT (selvagem) exibindo localização periférica das células alfa produtoras de glucagon, aumento de 400x, (c,d) Ilhota pancreática de camundongos que receberam as múltiplas doses de STZ e duas infusões de PBS (animais diabéticos) exibindo marcação desorganizada para o glucagon, refletindo as mudanças na arquitetura da ilhota após destruição das células beta, aumento de 100 e 400x, respectivamente.

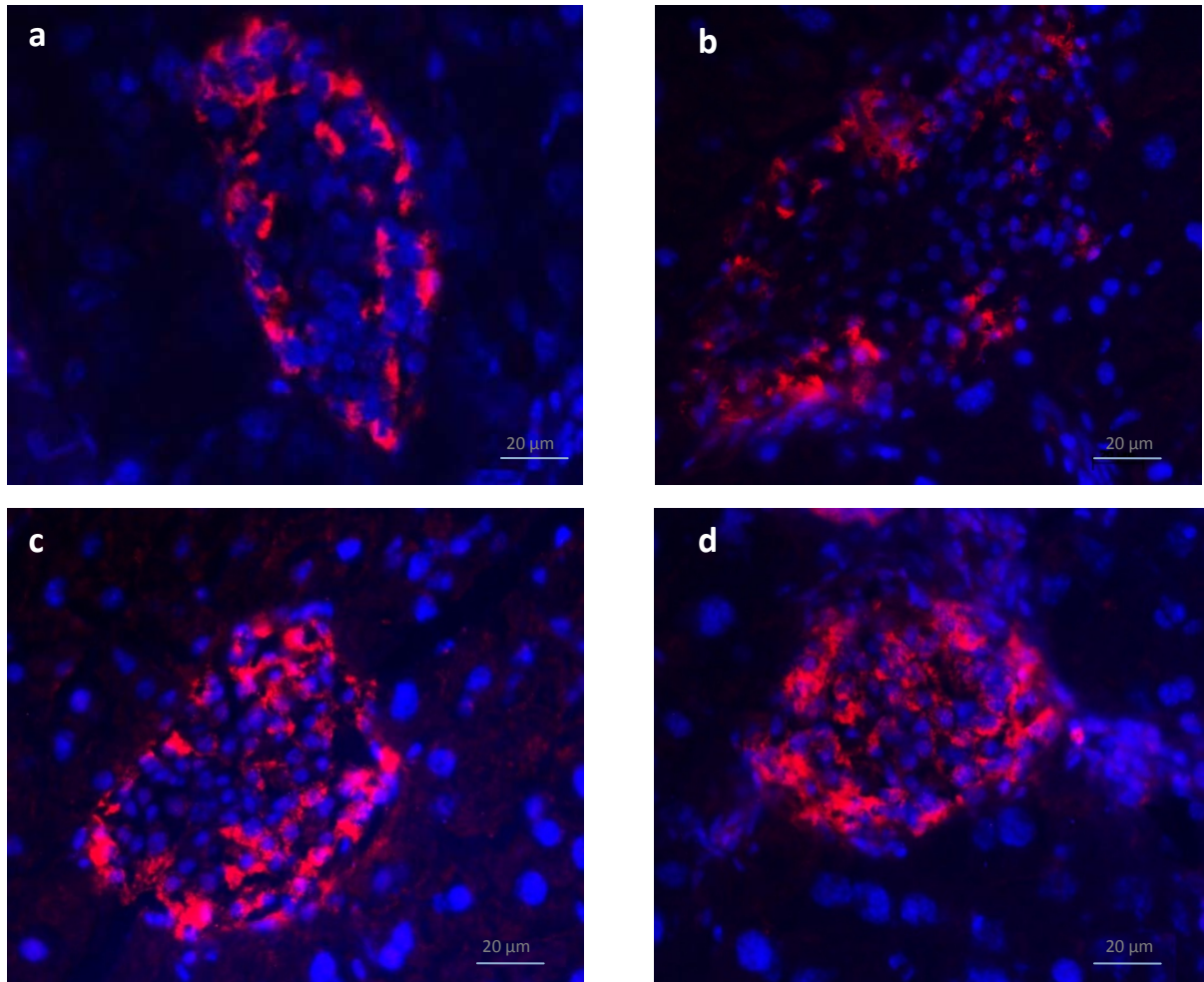


Figura 60. Avaliação da massa de células alfa produtoras de glucagon respondedores e não respondedores à terapia com MSCs. Cento e vinte dias após a segunda infusão de MSCs, o pâncreas dos animais foi coletado, congelado e cortado para realização da técnica de imunofluorescência. Foi utilizado um anticorpo rabbit anti-mouse anti-glucagon (vermelho), os núcleos foram corados com DAPI (azul) e visualizados sob microscópio de fluorescência. (a,b) Ilhotas pancreáticas de camundongos que responderam ao tratamento com MSCs (animais respondedores) exibindo localização periférica das células alfa produtoras de glucagon, aumento de 400x, (c,d) Ilhotas pancreáticas de camundongos que não responderam ao tratamento com MSCs (animais não respondedores) exibindo marcação desorganizada para o glucagon, refletindo as mudanças na arquitetura da ilhota após destruição das células beta, aumento de 400x.

5. Discussão

5. Discussão

Várias das alterações imunológicas presentes no diabetes autoimune do tipo 1 em humanos ou desenvolvidas de forma espontânea em camundongos diabéticos não obesos (NOD), também são documentadas no diabetes experimental induzido por múltiplas doses de STZ em camundongos C57BL/6. Por isso, nós escolhemos este modelo de diabetes quimicamente induzido que foi estabelecido há mais de 30 anos atrás, no qual é possível detectar o processo de insulite (inflamação nas ilhotas pancreáticas) e hiperglicemia resultante da destruição seletiva de células β produtoras de insulina. Neste contexto, é descrito que a STZ produz uma lesão inicial das células beta pancreáticas e esse processo destrutivo é amplificado pelas células do sistema imunológico, assemelhando-se desta forma da etiologia autoimune do diabetes tipo 1 (Ezquer et al., 2009). O desenvolvimento da doença é dependente de linfócitos T, sendo que a hiperglicemia e a insulite ocorre cerca de uma a duas semanas após administração das doses de STZ (Holstad et al., 2001). A contribuição das respostas imunes dependentes de células T na patogênese do diabetes induzido por múltiplas doses de STZ é comprovada pelas seguintes observações: (1) as células T são requeridas na indução do diabetes nesse modelo, uma vez que o estabelecimento da doença é inibido pela administração de anticorpos anti-CD3 ou pode ser induzida através da transferência adotiva de esplenócitos derivados de animais; (2) a suscetibilidade do diabetes por STZ foi aumentada em modelo transgênico de camundongos que super expressava a molécula CD80 nas ilhotas pancreáticas; (3) a STZ induz linfoproliferação *in vivo* dependente de células T e expressão transiente de antígenos complexados a moléculas de MHC-II; (4) a STZ estimula a secreção sistêmica de IFN- γ por linfócitos T; (5) e em modelo *ex vivo* a STZ aumenta a expressão dos genes do IFN- γ , TNF- α e IL-4 em tecidos pancreáticos de camundongos C57BL/6 machos susceptíveis quando comparados aqueles não tratados com STZ (revisado por Muller et al., 2002). No entanto, ainda não está totalmente elucidado os possíveis mecanismos imunológicos associados à progressão da doença neste modelo, principalmente no que se diz respeito a população de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17. Neste sentido, um dos objetivos principais do nosso trabalho foi estudar o papel dessas populações celulares no desenvolvimento do diabetes experimental.

Desta forma, na primeira etapa do nosso trabalho padronizamos o modelo de diabetes quimicamente induzido por múltiplas doses de STZ e posteriormente avaliamos as alterações morfológicas e imunológicas durante a evolução do diabetes experimental.

Após administração intraperitoneal de cinco doses diárias e consecutivas de STZ (40 mg/kg) em camundongos machos C57BL/6 (6-8 semanas), observamos um aumento das taxas de glicose sanguínea que atingiram níveis considerados elevados dez dias após a indução da doença. Já é bem estabelecido na literatura que níveis de glicose acima de 250 mg/dl no sangue de camundongos decorrem de um processo de deficiência da produção de insulina no organismo. Desta forma, nossos animais atingiram níveis superiores a esse limite onze dias após o tratamento com a droga ($301 \pm 105,34$ mg/dl) e, a partir desse momento, os animais se mostraram hiperglicêmicos por todo período de tempo analisado (110 dias). Por outro lado, os animais que receberam somente o veículo (tampão citrato de sódio) não apresentaram alterações na concentração de glicose sanguínea.

Para análise de alguns parâmetros morfológicos e imunológicos, os animais foram mortos e as amostras coletadas nos períodos de 6, 11, 18, 25 dias após o tratamento com STZ. Inicialmente acompanhamos, através de análises histopatológicas, as alterações que ocorreram no pâncreas endócrino no decorrer da doença, ou seja, as fases do processo inflamatório e destruição de células beta produtoras de insulina. Seis dias após a indução do diabetes, foi possível observar o início do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas caracterizado como peri-insulite e insulite. Nos dois períodos seguintes analisados (11 e 18 dias) observamos agravamento do processo de insulite, que provavelmente contribuiu para amplificar a destruição das células beta iniciadas pela STZ. Após 25 dias do tratamento com STZ, não observamos a presença de inflamação nas ilhotas dos camundongos diabéticos, mas um acentuado comprometimento das ilhotas pancreáticas, as quais mostraram-se com morfologia atípica (estreladas) e com tamanho reduzido. Nossas observações acerca da cinética do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas estão de acordo com alguns dados da literatura. Li e colaboradores (2000) mostraram um aumento progressivo de células mononucleares infiltradas nas ilhotas após administração de múltiplas doses de STZ em camundongos C57BL/6. Cinco dias após a indução da doença foi possível visualizar um grande número dessas células no interior das ilhotas, sendo que o pico do influxo de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas foi evidenciado no 9º dia. A partir desse período (16 dias após STZ), houve um declínio do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas com subsequente resolução da inflamação (23 dias após STZ) (Li et al., 2000). Em estudos conduzidos por Fukuda e colaboradores (2008) foi caracterizado algumas fases da progressão do diabetes induzido por STZ em camundongos C57BL/6, sendo que um dia após o término do tratamento com STZ foi constatado o pico da apoptose das células beta, 11 dias após STZ foi o índice máximo do infiltrado leucocitária nas ilhotas pancreáticas e 23 dias após STZ

caracterizou-se pela perda massiva das células beta produtoras de insulina (Fukuda et al., 2008).

Em nosso estudo, a massa de células beta pancreáticas produtoras de insulina foi avaliada através de duas metodologias distintas, sendo que a primeira utilizada foi a coloração de aldeído-fucsina (coloração de Gomori's) relatada no artigo de Peterson e colaboradores (1994) como uma coloração para detecção da insulina e a segunda foi a técnica de imunohistoquímica (streptavidina-peroxidase) utilizando-se um anticorpo anti-insulina. As duas metodologias evidenciaram uma perda progressiva da massa de células beta, correlacionando com o grau de inflamação das ilhotas, uma vez que em todos os períodos analisados os animais que receberam as doses de STZ apresentaram uma marcação para insulina muito menor do que aquela observada nos animais controles. A literatura nos mostra que no diabetes do tipo 1 a principal causa da destruição celular é a apoptose. Um dos principais agentes efetores indutores de apoptose das células beta no diabetes são os linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), os quais são capazes de danificar as células betas que expressam antígenos próprios através da secreção de perforina e granzima. Um aspecto interessante é que na ausência de perforina, a via Fas/FasL é responsável pela morte das células beta, sendo que a expressão da molécula Fas na superfície das células beta é aumentada na presença de $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$. Estas citocinas são secretadas por células T citotóxicas, células T $CD4^+$ e por macrófagos e interagem com receptores presentes nas células beta, atuando como fatores extrínsecos na indução da morte dessas células (Gysemans et al., 2008). Adicionalmente, as células T $CD4^+$ ativadas nos linfonodos pancreáticos migram para o pâncreas, ativam e recrutam outras células inflamatórias causando um processo de inflamação denominado como insulite. Esta fase de destruição de células beta é mediada por citocinas (como $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$) que desencadeiam uma sinalização pró-apoptótica nestas células ou a indução da expressão da molécula CD95 que ao interagir com o CD95L expresso nos linfócitos T culmina na apoptose dessas células (Roncarolo & Battaglia., 2007). Os macrófagos também contribuem de forma intensa para a destruição da massa de células beta, uma vez que eles são as primeiras células a infiltrarem nas ilhotas pancreáticas e produzem fatores solúveis (radicais livres de oxigênio, $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$) altamente tóxicos às células beta (Yoon & Jun, 2001).

Com relação às células alfa produtoras de glucagon, observamos um aumento da massa dessas células durante a progressão do diabetes induzido por STZ. Aparentemente nenhuma alteração pode ser verificada até o período de 11 dias após o tratamento com a droga, no qual as células alfa se localizavam na periferia da ilhota e em quantidade semelhante aos animais controles. Por outro lado, nos períodos de 18 e 25 dias após a indução

do diabetes foi possível observar uma maior densidade dessas células e uma localização mais interna (central) nas ilhotas, muito diferente dos animais controles. Sabe-se que a secreção de glucagon é anormal em pacientes acometidos com o diabetes tipo 1, e alguns estudos relatam um aumento no número das células alfa das ilhotas pancreáticas desses indivíduos. Li e colaboradores (2000) mostraram a expansão das células alfa no modelo de diabetes induzido por múltiplas doses de STZ. Neste trabalho, no período de 9 dias após indução do diabetes já foi possível observar células alfa no interior das ilhotas, sendo que no 16º dia o número de células alfa por ilhota aumentou consideravelmente em relação aos controles (aumento 2-3 vezes). Os autores observaram também a presença de células alfa no epitélio dos ductos pancreáticos, sugerindo uma diferenciação de células progenitoras em novas células produtoras de glucagon (Li et al., 2000). Resultados semelhantes puderam ser observados em estudo de O'Reilley (1997), no qual a formação de novas células alfa à partir de progenitores foi vista no ducto pancreático de camundongos NODs em resposta à perda de massa de células beta e consequente deficiência da produção de insulina (O'Reilley et al., 1997). As células alfa podem ser geradas através da diferenciação de células progenitoras presentes nos ductos pancreáticos ou através da replicação de células alfa presentes nas ilhotas. Vale a pena ressaltar que as células alfa passam a ocupar a região central da ilhota em virtude da morte e desaparecimento das células beta que antes ocupavam esta região (Li et al., 2000).

Com a finalidade de avaliarmos as possíveis alterações imunológicas no diabetes experimental induzido por STZ e que de alguma forma contribuíram para a progressão da doença, principalmente no que se refere à população de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17, realizamos uma imunofenotipagem de algumas populações de células nos baço (sistêmico) e nos linfonodos pancreáticos (local) dos animais tratados com STZ em diferentes estágios da doença. Inicialmente, analisamos as populações de células T $CD3^+CD4^+$ (linfócitos T *helper* ou auxiliares), células T $CD3^+CD8^+$ (linfócitos T citotóxicos), células $CD11b^+CD11c^-$ (macrófagos), células $CD11b^+CD11c^+/CD11b^-CD11c^+$ (células dendríticas). As populações de macrófagos e células dendríticas não se alteraram durante a evolução do diabetes, uma vez que a porcentagem dessas células não diferiu nos animais tratados com STZ e animais controles. No período de 6 dias após a administração das múltiplas doses de STZ, os animais que receberam a droga apresentaram uma maior porcentagem de células T $CD3^+CD4^+$ e T $CD3^+CD8^+$ no baço em relação aos animais que não receberam o tratamento com STZ. No entanto, nos demais períodos analisados (11, 18 e 25 dias após STZ), a porcentagem dessas células permaneceu semelhante em ambos os grupos estudados. Desta forma, podemos sugerir que nos períodos iniciais de desenvolvimento da

doença (cerca de 6 dias após administração de STZ) alguns antígenos liberados pelas células beta presentes nas ilhotas pancreáticas decorrente da toxicidade da STZ possivelmente caíram na corrente sanguínea e alcançaram o baço, gerando uma expansão e proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos para aqueles antígenos. No estudo de Zou e colaboradores (2008), os linfócitos T CD4 isolados do baço de camundongos Balb/c tratados com múltiplas doses de STZ possuíram taxa de proliferação maior do que as células isoladas de camundongos controles (não tratados), e o sobrenadante da cultura dessas células apresentaram altas concentrações de IFN- γ e IL-2 em comparação aos controles (Zou et al., 2008). No diabetes tipo 1, as células T CD4⁺ após expansão clonal, passam a expressar moléculas de adesão, como ICAM-1 e LFA-1, bem como receptores de quimiocina, como CCR4, CCR5 e CXCR3, que permitem que as células efetoras migrem para as ilhotas pancreáticas, dirigidas por um gradiente de quimiocinas e por fatores liberados pelas células da imunidade presentes no sítio inflamatório (Roncarolo & Battaglia., 2007).

Infelizmente, não foi possível avaliar essas mesmas populações celulares nos linfonodos pancreáticos dos animais, uma vez que a quantidade de células obtidas foi insuficiente para realizarmos todas as marcações desejadas. Uma possibilidade seria analisar essas células dentro da marcação de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ produtoras de IL-17, mas essas células já haviam sido ativadas para detectarmos os níveis de IL-17, e após o processo de ativação ocorre uma diminuição da expressão dos receptores CD4 e CD8 na superfície e desta forma estaríamos subestimando o valor real da porcentagem dessas células.

A identificação de um marcador específico para definir a população de células T reguladoras (Tregs) tem despertado muito interesse para a descoberta de algumas populações de células T CD4⁺ que podem prevenir doenças autoimunes, inflamatórias, alergias, infecções, tumores ateou mesmo induzir tolerância a transplantes. Uma ampla variedade de marcadores de células Tregs vem sendo utilizados, entre eles estão: CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3, CD127 e Foxp3. No entanto, muitas evidências têm sido acumuladas sugerindo que estes marcadores não são únicos e exclusivos de células Tregs (Corthay, 2009). Para muitos pesquisadores, as células T reguladoras são sinônimos de células T CD4⁺CD25⁺, uma vez que a molécula CD25 (cadeia α do receptor IL-2) é essencial no desenvolvimento e função das células Tregs. Entretanto, já foi mostrado por diversos trabalhos que todas as células T passam a expressar a molécula CD25 após ativação e que em muitas situações as células T CD4⁺CD25⁻ podem controlar a doenças mediadas linfócitos T, atuando com células reguladoras (revisado Ono et al., 2006). O CTLA-4 é um regulador negativo da ativação de células T, o qual é regulado positivamente em todas as células T CD4⁺ e CD8⁺ cerca de dois a

três dias após ativação. Similarmente, a expressão do GITR, PD-1 e LAG-3 é também induzida após ativação. Não obstante, as células que expressam baixos níveis de CD127 (Tregs CD127^{low}) teriam a capacidade de atuar como células reguladoras, porém já foi reportado que a maioria das células T CD4 ativadas regulam negativamente a expressão do CD127. Com relação ao Foxp3, já é bem documentado que a maioria das células T CD4 e CD8 humanas expressam de forma transitória este fator de transcrição após ativação (Corthay, 2009).

Tendo em vista a ampla heterogeneidade de possíveis marcadores para identificação das células T reguladoras, caracterizamos em nosso trabalho a população de células T CD4⁺CD25⁺, células T CD4⁺CD25⁺ que expressavam as moléculas reguladoras CTLA-4, GITR e PD-1 e as células T CD4⁺CD25⁺ positivas para o fator de transcrição Foxp3 presentes no baço dos animais. Além disso, todas as análises foram feitas para a população de células T CD4 que expressavam altos níveis de CD25 na superfície (CD25^{hi}), uma vez que muitos autores relatam a alta expressão dessa molécula na identificação das células T reguladoras (Roncarolo & Battaglia., 2007, Knip & Siljander., 2008). Nos linfonodos pancreáticos, em virtude do limitado número de células disponíveis, estudamos apenas as células T CD4⁺CD25⁺, T CD4⁺CD25^{hi} e aquelas positivas para o fator de transcrição Foxp3.

Com relação à população de células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} presentes no baço dos animais controles e tratados com STZ, não observamos diferenças significativas na quantidade dessas células em todos os períodos analisados. Observamos que os períodos de 6 e 11 dias, houve uma diminuição da porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ e células T CD4⁺CD25^{hi} que expressavam as moléculas reguladoras CTLA-4, GITR, PD-1 no baço dos animais tratados com STZ em relação aos não tratados. Além da redução da porcentagem dessas células, 6 dias após a administração de STZ, verificamos quantidades inferiores dessas moléculas na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ e células T CD4⁺CD25^{hi} dos animais diabéticos em comparação aos animais controles. Por outro lado, nos períodos mais tardios da doença (18 e 25 dias após indução diabetes) esse perfil de expressão das moléculas foi invertido, uma vez que os animais diabéticos apresentaram maior expressão de CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T CD4⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD25^{hi} do baço em relação aos animais controles. Essas observações podem ser explicadas pelas funções que essas moléculas exercem quando expressas nas células T reguladoras durante uma resposta imune, a fim de estabelecer um estado de homeostasia do sistema imunológico.

A supressão via CTLA-4 tem sido descrita como um dos possíveis mecanismos chave na supressão mediada por células T reguladoras. Primeiramente, as células Tregs Foxp3⁺, seja

natural ou induzida na periferia, expressam constitutivamente a molécula de CTLA-4. Segundo, camundongos deficientes de CTLA-4 nas células T ou mais precisamente nas células Foxp^+ desenvolvem espontaneamente doenças inflamatórias/autoimunes com linfoproliferação semelhante aquelas causadas pela depleção de células Tregs ou deficiência de Foxp3. Terceiro, o fator de transcrição Foxp3, juntamente com outros fatores, mantém a alta expressão do CTLA-4 nas células Tregs Foxp3^+ , atuando como um fator regulador na expressão de CTLA-4 (revisado por Sakaguchi et al., 2009). A presença das moléculas CD80 e CD86 é essencial na supressão mediada por células CD25^+ *in vitro*, sendo que sua ausência nas células T efectoras resulta em uma redução notável da atividade supressora exercida pelas Tregs. A ligação do CD80/CD86 presentes na superfície das células T efectoras com a molécula CTLA-4 presente nas células supressoras desencadeia sinais inibitórios nas células efectoras. As moléculas de CTLA-4 presentes nas células reguladoras podem também interagir com o CD80 e CD86 presentes nas células dendríticas, resultando na ativação daIDO, que culmina na diminuição da ativação das células T efectoras (revisado por von Boehmer, 2005).

A molécula GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) tanto humana quanto murina, é expressa em níveis basais em células T naive, sendo que as células T CD4^+ expressam níveis maiores de GITR do que as células T CD8^+ . Esta molécula é expressa constitutivamente na superfície de células T reguladoras (Tregs), mas sua expressão também é induzida após ativação. O ligante da molécula GITR, o GITRL, é expresso em macrófagos, células dendríticas imaturas e maduras além de linfócitos B. (Nocentini & Riccardi, 2005). Tendo em vista a alta expressão do GITR nas células T reguladoras $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$, muitos autores consideravam essa molécula como um possível marcador fenotípico para as células Tregs. No entanto, este conceito tem sido invalidado, uma vez que o GITR pode ter sua expressão aumentada em células T ativadas, pode ser expresso tanto em células T CD25^+ e CD25^- . Além disso, muitos estudos mostraram que o GITR parece não estar envolvido diretamente com a capacidade supressora das Tregs (Nocentini et al, 2007). A expressão da molécula GITR e do seu ligante GITRL parece ser um evento regulado tanto *in vitro* quanto *in vivo* durante o processo de ativação dos linfócitos T. Embora o GITR seja constitutivamente expresso em altos níveis nas células Tregs ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$), a expressão do GITR e do GITRL é aumentada rapidamente após estimulação do TCR das células T respondedoras (naive) e células apresentadoras de antígenos (APCs). A interação do GITR expresso nas células T respondedoras com o GITRL nas APCs durante o início da resposta imune pode aumentar a sobrevivência das células T, a produção de IL-2, diferenciação em linfócitos T efetores e resistência aos mecanismos supressores das Tregs. Com a progressão

da resposta imune, as células Tregs podem interagir com o GITRL expresso nas APCs. Na presença de IL-2, produzida inicialmente pelos linfócitos ativados, a sinalização via GITR pode levar a uma expansão não específica e ativação das células Tregs. Com a finalização da resposta, a expressão do GITR e GITRL diminui rapidamente nas células T efetoras e APCs, enquanto que simultaneamente a expressão do GITR é aumentada na superfície das Tregs (revisado por Shevach & Stephens, 2006). Alguns estudos indicam que a expressão da molécula GITR é regulada pelo fator de transcrição Foxp3, uma vez que a regulação negativa da expressão de Foxp3 em células humanas Tr1 leva a uma perda da capacidade supressora e diminuição da expressão de GITR, mas não da molécula CD25 (Veldman et al., 2006). A função do GITR expresso nas células T reguladoras ainda é uma questão polêmica. O GITR pode tanto estimular quanto inibir a atividade supressora dessas células. Alguns estudos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sugerem que a sinalização via GITR inibe a função das células Tregs. Em estudo de Shimizu e colaboradores (2002) os pesquisadores demonstraram que a utilização de um agonista do GITR gerou uma quebra na tolerância imunológica em virtude da inibição da atividade das Tregs. Portanto, a maioria dos estudos indicam que a sinalização via GITR nas células Tregs inibe as funções supressoras dessas células (Shimizu et al., 2002).

A molécula PD-1 (*programmed death-1*) é uma proteína transmembrana similar ao CTLA-4, mas não se liga ao CD80 nem ao CD86. O PD-1 não é expresso em células *naive* CD4, CD8 ou células mielóides, somente células T ativadas. Os ligantes do PD-1 são PD-L1 e PD-L2, os quais são membros da família de receptores B7. Enquanto que o PD-L1 é constitutivamente expresso em linfócitos T e B, macrófagos e células T CD4⁺CD25⁺, o PD-L2 tem sua expressão induzida apenas em células dendríticas e macrófagos, após estimulação com citocinas. A interação PD-1 – PD-L1 inibe a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e a produção de citocinas (Lehner, 2008). Tendo em vista o papel regulador destas moléculas estudadas, podemos pressupor que houve o aumento da expressão de PD-1 em células T reguladoras no final da progressão da doença (18 e 25 dias após STZ) na tentativa de controlar ou minimizar a resposta imune iniciada pela administração das múltiplas doses de STZ.

O fator de transcrição Foxp3 tem sido considerado o marcador mais característico das células T reguladoras. A expressão do Foxp3 é, na sua maioria, restrita às células Tαβ, sendo praticamente indetectável nos linfócito B, células Tγδ, células NK, macrófagos e células dendríticas. A expressão do Foxp3 é muito maior nas células T CD4⁺ em comparação com as células T CD8⁺. No baço e linfonodos de camundongos, a maioria das células T CD4⁺CD25⁺ expressam o fator Foxp3, mas há também uma pequena população de células CD4⁺ Foxp3⁺

que não expressa a molécula CD25. Apesar do Foxp3 ser considerado o “regulador máximo” das células T reguladoras, tem sido proposto que a real função deste fator de transcrição seria de amplificar e determinar características moleculares pré-estabelecidas das células Tregs. A expressão contínua de Foxp3 tem sido reportada como essencial para estabilizar modificações epigenéticas, como por exemplo a demetilação, para permitir o desenvolvimento de uma linhagem de células T reguladoras permanente. (Corthay, 2009).

Com relação às células T $CD4^+CD25^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}$ positivas para o fator de transcrição Foxp3, não observamos diferenças significativas na quantidade dessas células no baço de ambos os grupos de animais estudados. No entanto, a expressão do Foxp3 mostrou-se diminuída nas células provenientes do baço dos animais tratados com STZ nos dois primeiros estágios analisados (6 e 11 dias após STZ). Essa diminuição da expressão do Foxp3 pode estar associada com a baixa expressão observada nos mesmos períodos de CTLA-4 e GITR nas células dos animais tratados com STZ, uma vez que o Foxp3 parece regular a expressão dessas duas moléculas nas células T reguladoras (Sakaguchi & Yamaguchi, 2009)

Paralelamente, também quantificamos as populações de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+$ Foxp3⁺) e células produtoras de IL-17 nos linfonodos pancreáticos dos animais ou não tratados com STZ para avaliarmos as possíveis alterações locais que ocorrem durante a progressão da doença. Existem trabalhos na literatura que mostraram que células T reguladoras específicas acumulam-se nos linfonodos drenantes bem como no sítio inflamatório após imunização ou em resposta à inflamação tecidual (revisado por McGeachy et al., 2005). Em nosso estudo, observamos que somente no período de 6 dias após a indução do diabetes os animais tratados com STZ apresentaram maior quantidade de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^+$ positivas para Foxp3) nos linfonodos pancreáticos em relação aos controles, sendo que nos demais períodos a frequência dessas células manteve-se inalterada. No entanto, nos períodos posteriores (11 a 18 dias após STZ), os animais diabéticos desenvolveram intenso processo inflamatório, sugerindo que a ausência do acúmulo e/ou atividade supressora destas células estaria contribuindo para a progressão e severidade do diabetes do tipo 1. Uma das explicações plausíveis para nossas observações envolve a capacidade de certas citocinas em inibir a função das Tregs. Apesar de serem controversos os resultados na literatura, alguns trabalhos relatam a capacidade de algumas citocinas como IL-15, IL-18, IL-21, IL-4, IL-7, IL-6 e TNF- α em bloquearem a supressão por parte das Tregs (revisado por Walker, 2009). Korn e colaboradores mostraram em 2007 que células T reguladoras ($CD4^+$ Foxp3⁺) isoladas no sistema nervoso central de animais com EAE foram incapazes de suprimir a proliferação de linfócitos T efetores autorreativos

produtores de IL-6 e TNF- α (Korn et al., 2007). A IL-6 é geralmente produzida por células do sistema imune inato na presença de componentes bacterianos ou agentes infecciosos, mas no contexto da autoimunidade as próprias células T patogênicas podem ser a fonte desta citocina. Desta forma, os autores sugerem que para que as células Tregs atuem de maneira eficiente em limitar a autoimunidade em um determinado órgão, é necessário que a inflamação tecidual seja previamente controlada (Korn et al., 2007). Outra questão interessante é que a citocina IL-17 pode aumentar a produção de IL-6 e TNF- α por diversas células, induzindo de forma indireta a inibição da função das células T reguladoras (revisado por Kolls et al., 2004, Korn et al., 2007). Neste sentido, em nosso trabalho, observamos também um aumento de IL-6 e TNF- α no homogenato pancreático dos animais tratados com STZ, que poderiam atuar na inibição da atividade das Tregs, favorecendo a progressão do processo inflamatório e consequente destruição das células beta pancreáticas. Além disso, observamos um aumento na quantidade das células T produtoras de IL-17 nos linfonodos pancreáticos, que poderiam levar um aumento da produção de IL-6 e TNF- α , contribuindo ainda mais para o desenvolvimento da doença. Neste mesmo trabalho de Korn e colaboradores, os autores comentam que após a fase inflamatória da EAE, a população de células T efectoras se tornou suscetível à regulação pelas Tregs, e que esta resposta foi acompanhada por uma redução de IL-6 e TNF- α nesta fase da doença. Estas observações suportam a idéia de que após declínio dos níveis de IL-17, a produção de IL-6 e TNF- α diminui drasticamente, resultando na atividade supressora das Tregs (Korn et al., 2007). Em nosso estudo, observamos um aumento das células produtoras de IL-17 somente no início do desenvolvimento da doença, e paralelamente os níveis aumentados de IL-6 e TNF- α , que com o passar do tempo se mostraram em quantidades semelhantes aos animais controles (saudáveis), permitindo desta forma a regulação e finalização da resposta imune por parte das células Tregs. É possível que a função das células Tregs seja normal durante as doenças autoimunes, mas que a inflamação crônica envolvida nos sítios de lesão autoimune possa superar e restringir a função das células Tregs em controlar a resposta imune (Bettini & Vignali, 2009). Outro dado interessante é que em nosso trabalho encontramos tanto a população de células T produtoras de IL-17 quanto à população de células T reguladoras Foxp3 aumentadas nos linfonodos pancreáticos dos animais tratados com STZ seis dias após indução da doença. Esse fato pode ser explicado pelas observações de Stummvoll e colaboradores (2008), entre as quais que células Th17 são mais resistentes a supressão pelas Tregs em comparação as células Th1 e Th2. No entanto, as bases moleculares para esse fenômeno ainda não estão esclarecidas (Stummvoll e colaboradores, 2010). Desta forma, em nosso trabalho, o aumento observado na população de

células Th17 pode ser explicado por uma maior resistência dessas células a atividade inibidora das Tregs.

Há diversos trabalhos na literatura que mostram a participação das células produtoras de IL-17, principalmente as células Th17 (linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17) na patogênese de diversas doenças autoimunes como esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e lúpus eritematoso que anteriormente imaginava-se ser causada por células do padrão Th1 (revisado por Korn et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre a participação dessas células Th17 no desenvolvimento do diabetes, e por essa razão investigamos a alteração do número e possível papel dessas células produtoras de IL-17 em nosso modelo experimental de diabetes quimicamente induzido. Com relação às células T produtoras de IL-17, tanto CD4⁺ como CD8⁺, estas estiveram em frequências semelhantes no baço dos animais tratados com STZ e controles, sugerindo, desta forma, que em nosso modelo não tivemos nenhuma alteração sistêmica para esse tipo celular. No entanto, nos linfonodos pancreáticos, observamos um aumento na frequência dessas células no período inicial de desenvolvimento da doença (6 dias após STZ), mas este evento foi restabelecido com o passar do tempo. No entanto, apesar do aumento nos linfonodos pancreáticos, não observamos alterações nos níveis de IL-17 no homogenato pancreático, somente de IL-6, TNF- α e IFN- γ , sugerindo que estas células não estão envolvidas diretamente da destruição das células beta pancreáticas, mas que devem ficar preferencialmente retidas nos linfonodos pancreáticos dirigindo e amplificando a resposta imune de padrão Th1.

Neste contexto, Emmanuelle e colaboradores, em 2009, descreveram que as células Th17 regulam o desenvolvimento do diabetes em camundongos NODs. Neste estudo, a inibição das células Th17, seja pela neutralização da IL-17 (anticorpo anti-IL-17) ou pela utilização da IL-25 recombinante, impediu o desenvolvimento da doença, sugerindo dessa forma um papel central das células Th17 na patogênese do diabetes autoimune em camundongos NODs. Entretanto, este estudo mostrou que as células Th17 não contribuem para iniciar o processo autoimune, mas participam preferencialmente na fase efetora da doença, de forma a amplificar o processo iniciado por outras células do sistema imunológico. Outra observação importante foi que as células Th17 estavam presentes em baixa frequência no processo de insulite, sugerindo que estas células não participam diretamente da destruição das células β presentes nas ilhotas pancreáticas e ao invés disso, permanecem nos órgãos linfóides secundários a fim de direcionar e aumentar a resposta imune contra as células β pancreáticas (Emmanuelle et al., 2009). Em outro estudo, Martin-Orozco e colaboradores diferenciaram *in vitro* células T de baço e linfonodos de camundongos com TCR transgênico

(BDC2.5) em células Th17 e as transferiram para animais NOD.scid e NOD neonatos. Camundongos NOD.scid desenvolveram diabetes rapidamente e apresentaram intensa inflamação e destruição das ilhotas, enquanto que a maioria dos camundongos NODs neonatos não desenvolveram a doença, apesar de apresentarem insulite extensa. Um resultado muito interessante foi que as células BDC2.5⁺ recuperadas dos camundongos NOD.scid, ao contrário daquelas recuperadas dos NODs, expressavam maiores quantidades de IFN- γ do que IL-17, indicando que aquelas células Th17 se diferenciaram em células Th1 no recipiente linfopênico e estas foram responsáveis pelo desenvolvimento e severidade da doença (Martin-Orozco et al., 2009). De forma similar, Bending e colaboradores mostraram que células Th17 altamente purificadas e isoladas de camundongos BDC2.5 promoveram a indução e o desenvolvimento do diabetes quando transplantadas em camundongos NOD.scid após se converterem em células produtoras de IFN- γ . O tratamento desses animais com anticorpo que bloqueia a IL-17 não surtiu nenhum efeito, enfatizando o papel do IFN- γ e das células Th1 na patogenicidade da doença. Esses dados sugerem um potencial de plasticidade das células Th17, pois mesmo após diferenciação, estas tiveram a capacidade de se converterem em outro subtipo celular (Th1) (Bending et al., 2009).

De acordo com os trabalhos mostrados na literatura e com base nos resultados obtidos no presente estudo podemos sugerir que no diabetes, ao contrário de outros modelos de doenças autoimunes, a destruição das células alvo (células beta pancreáticas) está correlacionado com um padrão de resposta Th1, ao invés de Th17, e que essas células produtoras de IL-17 estariam preferencialmente empregadas no direcionamento das células do sistema imune e amplificação da resposta por células Th1 no órgão alvo. Para tanto, detectamos a concentração das citocinas presentes no homogenato pancreático, uma vez que a presença desses fatores solúveis no microambiente pancreático, ou seja, no local de inflamação interfere de maneira indireta na indução ou limitação da destruição celular. Observamos que seis dias após a administração das múltiplas doses de STZ os animais tratados com a droga apresentaram níveis elevados de IL-6, TNF- α e IFN- γ em comparação com os animais controles. O período de onze dias após a indução do diabetes demonstrou níveis reduzidos de IL-10 no homogenato pancreático dos animais que receberam a STZ em comparação com os animais controles. Em contrapartida, o período de vinte e cinco dias revelou níveis aumentados de IL-10 no pâncreas dos animais diabéticos em comparação aos animais controles.

A presença das citocinas próinflamatórias como IL-1, TNF- α e IFN- γ produzidas por leucócitos resulta em um mecanismo de injúria e apoptose da célula beta no modelo de

diabetes induzido por múltiplas doses de STZ (Fukuda et al., 2008). O papel desses mediadores solúveis no desenvolvimento do diabetes é desencadeado pelo seu efeito tóxico direto na destruição das células beta e/ou na regulação da diferenciação e função das células T (Herold et al., 1996). Fukuda e colaboradores (2008) observaram níveis aumentados de RNA mensageiro de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-4 e iNOS nas ilhoas pancreáticas isoladas de camundongos tratados com STZ duas semanas após a indução da doença. Durante a resposta imune mediada por células, o TNF- α é secretado pelos macrófagos e pode estimular de forma autócrina a produção de outros mediadores inflamatórios, como a IL-1 β e a IL-6 e aumentar sua função efetora (Holstad & Sandler, 2001). Holstad & Sandler em 2001 mostraram que a utilização de um inibidor transcricional do TNF- α protege parcialmente os animais do desenvolvimento da hiperglicemia e reduz o processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas. No entanto, este inibidor não preveniu a doença quando esta foi induzida de forma direta pela alta toxicidade das células beta através da administração de uma única e elevada dose de STZ, mostrando desta forma o papel do TNF- α na doença mediada pelo sistema imune (Holstad & Sandler, 2001). Outro trabalho que mostrou o papel do TNF- α na indução do diabetes foi mostrado por Pakala e colaboradores (1999), no qual camundongos NODs que possuíam as ilhotas pancreáticas deficientes de receptores de TNF- α estiveram protegidas do diabetes e, além disso, as células T CD4⁺ exibiram capacidade alterada de estabelecer o processo de insulite e causar a destruição das células beta (Pakala et al., 1999). Estes resultados demonstram a importante participação do TNF- α na lesão tecido-específica das células beta produtoras de insulina.

A citocina IFN- γ é secretada por células do sistema imune inato (células NK, células T $\gamma\delta$) e por células da imunidade adquirida (células T CD4⁺ e CD8⁺). Além da sua atividade anti-viral, o IFN- γ têm uma ampla variedade de funções biológicas, as quais incluem: aumento da apresentação de antígenos via MHC-I e MHC-II, influências no ciclo celular, crescimento e apoptose, migração de leucócitos e interações leucócito-endotélio, atuação em diversas funções reguladoras do sistema imune, como por exemplo a inibição da diferenciação de células do padrão Th2 (Chen & Liu, 2009). Além disso, tem sido mostrado que o IFN- γ pode ter efeitos diretos em ilhotas de roedores, resultando em uma perda na tolerância aos antígenos das ilhotas que resulta no desenvolvimento do diabetes autoimune (Zou et al., 2008).

A citocina IL-6 é produzida pela maioria das células do sistema imunológico, bem como células endoteliais, células musculares, células beta pancreáticas, hepatócitos, entre outras. No entanto, o receptor de IL-6 (IL-6R α) é encontrado principalmente em hepatócitos,

em algumas células endócrinas e em leucócitos. A citocina IL-6 esteve presente no início e durante a vigência do processo inflamatório das ilhotas pancreáticas de camundongos NODs. Observações de que a expressão de IL-6 é aumentada em camundongos NOD fêmeas em comparação com camundongos NOD machos suporta a suposição de que essa citocina participa da patogênese da doença. No entanto, a IL-6 isoladamente é incapaz de induzir ou promover a destruição das células beta pancreáticas, necessitando de outros fatores adicionais, como por exemplo a presença de outras citocinas pró-inflamatórias (revisado por Kristiansen et al, 2005).

Embora a citocina IL-10 não seja essencial para supressão *in vitro*, esta citocina é considerada uma das moléculas cruciais na imunossupressão *in vivo*, e merece, portanto uma atenção especial e minuciosa. Inicialmente, foi reportado que a estimulação antigênica crônica *in vivo* pode resultar na geração de células T CD4 que são anérgicas em termos de proliferação, mas que secretam IL-10 no ambiente onde estas células residem. Posteriormente, foi mostrado que células T CD25⁻ com baixa expressão de Foxp3 mas com capacidade de secretar IL-10 foram identificadas após estimulação antigênica crônica. Estas células ficaram conhecidas como células Tr1, sendo caracterizadas pela baixa expressão de Foxp3 e capacidade de produzir IL-10. (revisado por von Boehmer, 2005)

As células T reguladoras naturais (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) e as células T reguladoras do tipo 1 (Tr1), através de mecanismos distintos bloqueiam a ativação e a função de células T efetoras, agindo de forma direta ou indireta sobre as células apresentadoras de antígenos. A expressão de moléculas de adesão e os receptores de quimiocinas podem ser suprimidos pela ação das células T reguladoras, resultando em redução na capacidade de migração das células para o tecido alvo. A severidade da insulite é também diretamente inibida pelas células Tregs, células Tr1, através da liberação de IL-10 e TGF- β que reduzem a inflamação e restabelece a homeostasia do organismo (Roncarolo & Battaglia., 2007). McGeachy e colaboradores (2005) investigaram os mecanismos naturais da resolução da EAE em modelo de camundongos imunizados por MOG. No início de desenvolvimento da doença, os pesquisadores verificaram que a proporção de células T CD4 que produziam IFN- γ era maior do que as células T CD4 produtoras de IL-10. Com o passar do tempo, a população de células T produtoras de IL-10 aumentou e correlacionou com a melhora dos animais. Desta forma, os pesquisadores mostraram que a citocina IL-10 foi crucial para a resolução da doença e que ela era produzida por células T CD4⁺CD25⁺ presentes no sistema nervoso central (SNC). Os autores propuseram que as células Tregs agiriam diretamente no sítio inflamatório (via IL-10),

inibindo a função efetora de células T patogênicas e/ou através da modulação da resposta de células do sistema imune inato (McGeachy et al., 2005).

Neste sentido, também observamos um aumento de IL-10 somente no período mais tardio de desenvolvimento da doença (25 dias após STZ), que coincidiu com uma ausência de infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas e aumento das moléculas reguladoras (CTLA-4, GITR e PD-1) nas células T CD4⁺CD25⁺ do baço dos animais diabéticos. Desta forma, podemos sugerir que mecanismos de regulação mediado por células do sistema imunológico parecem atuar em uma fase mais tardia, uma vez que as moléculas reguladoras estiveram com expressão aumentada e a citocina supressora IL-10 esteve presente em altas concentrações no pâncreas dos animais tratados com STZ. No entanto, não podemos concluir qual é a fonte dessa citocina, ou seja, a célula produtora de IL-10, uma vez que não observamos aumento da população de células T CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais diabéticos. É proposto na literatura que uma das possíveis fontes de IL-10 seria as células T reguladoras que possuem baixa expressão de Foxp3 (células Tr1) ou até mesmo linfócitos B produtores de IL-10 como citado no trabalho de Fillatreau e colaboradores (2002) em modelo de EAE experimental.

Em pacientes com diabetes do tipo 1 (DM-1), a hiperglicemia é manifestada após uma acentuada perda de massa de células beta produtoras de insulina e que aparentemente é um processo irreversível. Os tratamentos para o DM-1 existentes atualmente não estão focados na regeneração pancreática, mas no controle dos níveis de glicose no sangue, mas que, por outro lado, não previnem as complicações de longo prazo desencadeados por esta patologia. Desta forma, um tratamento ideal para o diabetes visa o restabelecimento das funções pancreáticas e renais de pacientes nos quais a doença já se estabeleceu (revisado por Abdi et al., 2008). Sendo assim, o segundo objetivo principal de nosso estudo foi avaliar o potencial terapêutico de células mesenquimais estromais (MSCs) derivadas de medula óssea no tratamento do diabetes experimental.

Primeiramente, as MSCs foram isoladas a partir de aspirado de medula óssea de indivíduos saudáveis. Estas células foram plaqueadas, cultivadas em meio específico (α -MEM contendo 15% soro fetal bovino) e expandidas. As MSCs humanas apresentaram morfologia fibroblastóide típica e cresceram aderidas ao plástico. A aderência ao plástico é uma característica muito bem descrita para a população de células estromais mesenquimais (Colter et al, 2000) e embora estas células possam ser cultivadas em suspensão, a grande maioria dos

trabalhos utilizam a metodologia padrão de cultivo dessas células em garrafas de cultura de plástico (Dominici et al., 2006).

No momento em que as MSCs atingiram a terceira passagem, essas células foram coletadas por tripsinização e imunofenotipadas quanto a diversos marcadores de superfície. A expressão de antígenos de superfície permite uma rápida identificação de uma determinada população celular, e tem sido amplamente utilizada na área da imunologia e hematologia. Para a identificação das MSCs, Dominici e colaboradores propuseram durante reunião da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (2006) que as MSCs expressam altos níveis de CD105, CD73 e CD90. No entanto, novos marcadores de superfície têm sido identificados, ampliando ainda mais o painel de marcadores de superfície das MSCs. Além disso, os autores sugerem uma melhor investigação sobre outros marcadores hematopoéticos, como CD45, CD34, CD14, CD19 e MHC-II, uma vez que as MSCs devem expressar baixos níveis dessas moléculas na superfície (Dominici et al., 2006). Em nosso estudo, as MSCs utilizadas nos experimentos apresentaram alta expressão de CD73, CD90, CD105, CD29, CD13, CD44, CD49e e CD166; expressão intermediária de CD54; HLA-CLASSE I, CD146, CD105 e expressão negativa de CD45, CD14, CD34, HLA-CLASSE II, CD51/61 e CD31, caracterizando desta forma nossa população de células como MSCs.

Outro quesito importante na caracterização das MSCs, sugerido também por Dominici e colaboradores (2006), é em relação à capacidade de diferenciação das MSCs em outras células da linhagem mesodérmica, como adipócitos, osteócitos e condrócitos. Desta forma, realizamos os ensaios de diferenciação das MSCs *in vitro*, na presença de meios indutores de adipogênese e osteogênese, e observamos que estas células foram capazes de apresentar acúmulo de gordura no interior das células (diferenciação em adipócito) e depósitos de cálcio (diferenciação em osteócitos).

Após a caracterização das MSCs, estas células foram transplantadas em camundongos diabéticos para avaliarmos seu potencial terapêutico no diabetes experimental. Para isso, o diabetes foi induzido em camundongos machos da linhagem C57BL/6 através de cinco doses diárias e consecutivas de estreptozotocina (STZ, 40 mg/dl). Os animais receberam duas infusões de MSCs via plexo orbital, com intervalo de sete dias entre cada infusão (dias 21 e 28 após o tratamento com STZ). A quantidade de células infundidas no primeiro transplante ($0,5 \times 10^6$ células) foi menor do que a infundida no segundo transplante (1×10^6 células), uma vez que não obtivemos disponibilidade de células para realizarmos a primeira infusão com um número maior de células. O grupo controle recebeu apenas o tratamento com as cinco doses de STZ, sendo que no momento dos transplantes eles receberam injeções contendo apenas o

veículo (PBS+Pulmozyme). Nós observamos que 21 e 28 dias após a indução do diabetes (período das infusões de MSCs) os animais apresentavam níveis elevados de glicose no sangue sugerindo uma intensa destruição de células beta produtoras de insulina. Essa hiperglicemia não foi controlada nos animais de forma espontânea, uma vez que o grupo que recebeu somente infusões de PBS (grupo controle), manteve-se com níveis muito elevados de glicose no sangue por todo o período observado (120 dias). A maioria dos animais (n=5) que recebeu as duas infusões de MSCs indiferenciadas, derivadas de medula óssea humana, e administradas quando os sinais da doença eram evidentes, apresentaram níveis normais de glicose sanguínea nos períodos finais do estudo indicando que estas células foram capazes de reverter a hiperglicemia. No entanto, dois animais não responderam à terapia, e aparentemente nenhum fator estrutural esteve relacionado com este tipo de resposta. De fato, esses animais apresentavam peso corpóreo e taxa glicêmica muito semelhante aos animais que responderam ao transplante, não sendo, portanto, um problema de tamanho ou metabolismo. Podemos pensar que nesses animais a circulação das MSCs pode ter sido prejudicada, ou seja, essas células poderiam ter formado grumos celulares durante as infusões e desta forma, terem ficado retidas em outros órgãos (p.ex. pulmão) prejudicando, desta forma, o efeito regenerativo das MSCs no pâncreas. No estudo de Boumaza e colaboradores (2009), os autores relataram que nem todos os animais (ratos Lewis) que receberam infusões de MSCs autólogas responderam da mesma forma à terapia. Neste trabalho foi mostrado que quando as MSCs foram injetadas nos dias 4 e 10 após indução do diabetes (1 dose de STZ), apenas dois animais revertem a hiperglicemia e o restante (n=6) permaneceu hiperglicêmico por todo período analisado (21 dias após indução da doença). Quando as células foram administradas nos dias -2 (antes da indução), 4 e 10, apenas três animais responderam e quatro não responderam. No entanto, os autores não discutem os possíveis mecanismos envolvidos para tais observações, sugerindo apenas possíveis diferenças entre os indivíduos.

Nos animais que responderam à terapia, mostramos que as MSCs revertem a hiperglicemia uma vez que as taxas glicêmicas de todos os animais retornaram aos níveis normais, e o sucesso dessa intervenção poderia estar relacionado com uma possível regeneração das ilhotas e aumento das células beta produtoras de insulina. Sendo assim, fizemos reações de imunofluorescência para mensurar a massa de células produtoras de insulina em todos os grupos de animais. Através desses ensaios, foi possível observar que as ilhotas pancreáticas dos animais que conseguiram reverter a hiperglicemia apresentavam uma maior densidade de células produtoras de insulina quando comparadas ao grupo que não recebeu as MSCs (controle). Além disso, as MSCs foram capazes de restabelecer a

organização estrutural das ilhotas (arquitetura) nestes animais, mostrando que as MSCs não só aumentaram a densidade de células beta, mas também limitaram a expansão desorganizada de células alfa produtoras de glucagon, uma vez que esse fenômeno é um mecanismo compensatório bem descrito em indivíduos com DM-1. Portanto, nossos resultados indicaram que o transplante de MSCs derivadas de medula óssea de indivíduos saudáveis (humanos) contribuiu para a regeneração pancreática no modelo de diabetes induzido por STZ em camundongos C57BL/6.

Embora os animais que responderam à terapia com MSCs apresentassem redução da hiperglicemia, as ilhotas desses animais não apresentaram a mesma quantidade de células produtoras de insulina quando comparados aos animais selvagens (WT). Resultados semelhantes foram obtidos por Ezquer e colaboradores (2008), onde os pesquisadores atribuem essa menor quantidade de células beta presentes nos animais tratados com a MSCs em relação ao animal saudável (WT) a um processo de regeneração incompleto. Através da curva de tolerância a glicose, mostramos que os animais que responderam à terapia possuíam insulina circulante suficiente para restabelecer os níveis normais de glicose no sangue, uma vez que a glicemia no final do teste foi semelhante a do início do teste. Esses animais que responderam ao tratamento apresentaram curva semelhante aos animais WT, no entanto, eles apresentaram um grande aumento da glicose sanguínea 15 minutos após a administração da glicose ($426,6 \pm 13,6$ mg/dl), sendo esse aumento muito maior do observado nos animais WT ($194,5 \pm 2,1$ mg/dl), sugerindo mais uma vez que a quantidade de insulina presente nesses animais é ainda inferior a dos animais WT. Por outro lado, os animais que não responderam aos transplantes exibiram o mesmo padrão de curva daqueles animais que não receberam as infusões de MSCs (controle). Nestes dois grupos de animais a glicemia ao final do teste foi superior a da início do teste, refletindo uma insuficiência na quantidade de insulina circulante. No estudo de Ezquer e colaboradores (2008), foi administrada uma única dose de MSCs murinas ($0,5 \times 10^6$ células) em camundongos C57/Bl6 após 21 dias de tratamento com STZ. Os animais foram capazes de reverterem a hiperglicemia através da geração de novas células beta e conseqüente regeneração das ilhotas pancreáticas. No entanto, a curva de tolerância a glicose destes animais não foi tão satisfatória quanto à obtida em nosso trabalho. No trabalho de Ezquer, os animais tratados com MSCs não conseguiram retornar aos níveis de glicose apresentados no início do teste, por isso os autores discutem que a insulina produzida pela massa de células beta recém geradas só conseguem reverter a hiperglicemia em condições normais de consumo de glicose e que para a correção da glicemia em uma situação de alta ingestão de glicose uma segunda infusão de MSC seria necessária (Ezquer et al., 2008).

Em nosso estudo, só foi possível observar uma reversão total da hiperglicemia 120 dias após o segundo transplante. Cerca de 30 dias após a infusão das células, os animais que responderam à terapia apresentaram níveis reduzidos de glicose sanguínea, mas eles só atingiram níveis normais de glicemia no final de quatro meses. No trabalho publicado por Ezquer e colaboradores, uma única infusão intravenosa de $0,5 \times 10^6$ MSCs em camundongos tratados com STZ (21 dias após indução) ocasionou redução das taxas de glicose no sangue uma semana após a infusão que retornou a níveis considerados normais (>200 mg/dl) 30 dias após a administração das células. No trabalho de Lee e colaboradores, a queda na glicemia dos animais tratados com duas doses de MSCs humanas (2×10^6 células nos períodos de 6 e 13 dias após STZ) foi observada sete dias após a segunda infusão. Quando comparado com os demais trabalhos publicados, podemos atribuir este atraso na reversão da glicemia à origem diferencial das MSCs utilizadas e a dinâmica de distribuição dessas células. Nós utilizamos MSCs derivadas de medula óssea humana, e essas células possuem um tamanho (diâmetro) muito maior do que as MSCs murinas. Desta forma, podemos pensar que uma parte dessas células pode ter sido aprisionada em outros órgãos (p.ex pulmão), em virtude de seu diâmetro, dificultando desta forma a migração dessas células para a área lesionada. Sendo assim, teríamos um menor número de células aptas a migrarem para o local de injúria e desenvolverem seu potencial terapêutico. De acordo com essa hipótese, Schrepfer e colaboradores mostraram que dentro de poucos segundos após injeção intravenosa de MSCs, a maioria das células foram encontradas nos pulmões dos camundongos, e sugeriram que o tamanho das células é fator chave deste fenômeno observado (Schrepfer et al., 2000). Alguns estudos sugerem que o aprisionamento das MSCs no pulmão pode alterar a habilidade das células em migrar para os tecidos, levando a um acúmulo não-específico no sistema retículo-endotelial de alguns órgãos. Furlani e colaboradores (2009) utilizando diferentes concentrações de MSCs humanas derivadas de tecido adiposo (1×10^6 ou $0,2 \times 10^6$ céls) injetadas na aorta abdominal verificou uma expressiva redução em 60% da velocidade do sangue arterial 1 minuto após a injeção de 1×10^6 MSCs e observou também que a microcirculação sanguínea foi interrompida 174 segundos após transplante. Contudo, cerca de 40% dos animais que receberam 1×10^6 céls e 25% dos que receberam $0,2 \times 10^6$ morreram de embolia pulmonar (Furlani et al., 2009).

O trabalho da literatura que mais se assemelha ao nosso foi o trabalho de Lee e colaboradores (2006) que usou MSCs humanas em camundongos diabéticos enquanto que todos os demais trabalhos existentes utilizam MSCs murinas. No entanto, o modelo utilizado por Lee é considerado um modelo de diabetes incompleto, uma vez que os animais utilizados

eram da linhagem Nod.scid, deficientes portanto de linfócitos T e B. Além disso, as doses de STZ (4 doses de 35mg/kg) foram menores do que as utilizadas em nosso estudo. Outra diferença foi que no estudo de Lee et al. foram administradas duas doses de 2×10^6 células no interior do ventrículo esquerdo, melhorando desta forma, a mobilização das células para todos os órgãos do corpo e garantindo dessa forma o efeito das MSCs no pâncreas dos animais tratados.

Por motivos técnicos não estudamos a dinâmica de distribuição das MSCs em nosso modelo de diabetes, mas a maioria dos trabalhos existentes na literatura mostrou que poucas MSCs ficam retidas no pâncreas, sendo que a maioria desaparece pouco tempo depois da infusão. Ezquer e colaboradores (2008) observaram raras MSCs marcadas com corante fluorescente no pâncreas e rins dos animais 62 dias após infusão das células. No estudo de Lee e colaboradores, 15 dias após a segunda infusão de MSCs humanas, foi encontrado no pâncreas DNA de origem humana correspondente a 3% do total de células injetadas e nos rins essa frequência foi maior, de cerca de 11% do total das células injetadas. A infusão intraventricular, ao invés da infusão intravenosa, provavelmente diminuiu o aprisionamento de células nos capilares pulmonares, uma vez que nenhum DNA humano foi detectado nos pulmões. Boumaza e colaboradores (2009) detectaram DNA das MSCs transplantadas no pâncreas dos animais 7 e 14 dias após o transplante, no entanto, nenhuma banda de DNA pode ser observada nos dias 2 e 5 após o transplante, sugerindo que as MSCs levam um certo tempo até atingirem e se instalarem no pâncreas. Madec e colaboradores (2009) estudaram a migração das MSCs marcadas com CFSE em camundongos NODs e observaram que as células migraram preferencialmente para os linfonodos pancreáticos, sendo que o pico de detecção dessas células no linfonodo foi de cinco dias após a infusão. Por outro lado, os autores não detectaram as MSCs no pâncreas dos animais tratados em nenhum dos períodos analisados (5, 11 e 18 dias após infusão).

Não foi possível estudar os mecanismos associados aos efeitos terapêuticos apresentados pelas MSCs neste modelo experimental. No entanto, diversos trabalhos mostraram uma possível permanência das MSCs no pâncreas e outros órgãos acometidos pela doença. Dois mecanismos possíveis podem explicar a regeneração das ilhotas pancreáticas: diferenciação das MSCs em células beta produtoras de insulina ou estimulação da diferenciação e proliferação de células progenitoras endógenas/locais pela secreção de fatores de crescimento e citocinas pelas MSCs (Abdi et al., 2008). As MSCs naturalmente produzem uma variedade de citocinas e fatores de crescimento. As propriedades secretórias das MSCs podem ser fortemente influenciadas pelo microambiente que as circulam. Estudos recentes

têm mostrado que, em condições de hipóxia ou após manipulação gênica *in vitro*, as MSCs podem produzir várias citocinas como IGF-1, VEGF e HGF, as quais possibilitam a sobrevivências das células vizinhas, sendo esse fenômeno chamado de efeito parácrino das MSCs. Desta forma, a função parácrina das MSCs e não a capacidade de trans-diferenciação dessas células quando transplantadas, parecem ser o ponto crucial na reversão da hiperglicemia de modelos animais de diabetes (Xu et al., 2008). O efeito parácrino possibilita que haja no local da lesão um aumento da angiogênese, uma maior proteção celular, diminuição da inflamação, além de aumento da mitose e diminuição da apoptose das células locais. A migração das MSCs para o pâncreas promove a secreção contínua de fatores tróficos como IGF-1, VEGF, HGF e outros, prevenindo a apoptose das células beta e possibilitando a regeneração do pâncreas através da proliferação das células progenitoras endógenas (Xu et al., 2008).

No estudo de Lee e colaboradores, a minoria das MSCs detectadas no pâncreas parecem ter se diferenciado em células beta, uma vez que poucas células foram positivas para B2-microglobulina (marcar MSC humana) juntamente com PDX-1 e insulina humana. Desta forma, o maior efeito das MSCs neste modelo foi promover um aumento do número de ilhotas e de células murinas produtoras de insulina, ao invés de se diferenciarem em células produtoras de insulina humana. Boumaza e colaboradores (2009) mostraram que após administração de MSCs autólogas em ratos Lewis houve um aumento da expressão de PDX-1 e insulina nas ilhotas pancreáticas dos animais que receberam essas células. Desta forma, os autores sugerem que a secreção de diversos fatores bioativos e de crescimento pelas MSCs no sítio de destruição das células beta pode estabilizar ou alterar o microambiente tecidual, estimulando o crescimento, sobrevivência e a diferenciação de células beta através da ativação do PDX-1 e a partir daí aumentar a expressão de insulina nas ilhotas. Além disso, neste mesmo trabalho, as MSCs alteraram o perfil da resposta imune nos animais, uma vez que as citocinas de padrão Th2 e células T reguladoras Foxp3⁺ estiveram aumentadas nos animais tratados em comparação com os não tratados.

Urbán e colaboradores (2009) sugerem que após administração de MSCs em associação com células totais da medula óssea (BMCs) dois aspectos conferem o sucesso do tratamento podem atuar em paralelo e de forma sinérgica. Primeiro, esses dois tipos celulares poderiam ter induzido a regeneração das células produtoras de insulina via liberação de fatores de crescimento, e em segundo lugar, as MSCs foram capazes de inibir a resposta de linfócitos auto-reativos contra as células beta, permitindo que as células remanescente ou as recém geradas pudessem sobreviver e restabelecer os níveis normais de insulina dos animais.

Em adição, Lin e colaboradores (2009) avaliaram o mecanismo de reversão da hiperglicemia em ratos tratados com MSCs autólogas. Os autores utilizaram lentivírus que codifica RNAs de interferência para silenciar o gene da Neurogenina 3 (marcador bem estabelecido de células progenitoras das ilhotas), para descobrir se o efeito terapêutico da infusão das MSCs é resultado da diferenciação das MSCs em células beta de progenitores locais. Quando os pesquisadores administraram somente MSCs eles observaram queda nas taxas glicêmicas dos animais, aumento do número de células beta/ilhota e aumento do conteúdo de insulina intracelular. No entanto, ao utilizarem MSC+ lentivírus (RNA Ngn3), o efeito terapêutico não foi tão expressivo, uma vez que a queda da glicemia não foi evidente, o número de células beta/ilhota diminuiu assim como o conteúdo de insulina mostrou-se reduzido em relação ao animal tratado somente com MSCs (Lin et al., 2009). Desta forma, os autores sugerem que o efeito terapêutico das MSCs no modelo de diabetes induzido por STZ ocorreu principalmente pela diferenciação de células progenitoras locais (endógenas) ao invés da diferenciação das MSCs em células beta. No estudo de Madec e colaboradores (2009), os pesquisadores estudaram o potencial das MSCs em prevenir e reverterem o diabetes em camundongos NODs. No estudo preventivo, foram administradas 10^5 MSCs alogênicas (Balb/c) em camundongos NODs fêmeas de 4 semanas de idade e foi observado que a administração de MSCs retardou o início da manifestação da doença, bem como diminuiu a incidência do diabetes espontâneo nestes animais. Com relação ao potencial terapêutico, as MSCs (10^5 - 10^6 células) foram administradas juntamente com linfócitos T diabetogênicos em camundongos irradiados, e pode-se observar que o tratamento com as MSCs induziu redução da incidência da doença nos animais tratados, bem como atenuou a inflamação nas ilhotas pancreáticas quando comparados com os animais que receberam apenas os linfócitos. Além disso, as MSCs foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos *in vitro* e induzir um aumento na população de células T reguladoras Foxp3⁺. Desta forma, os autores sugerem que as MSCs atuaram neste modelo de diabetes através de mecanismos de imunomodulação ao invés de regeneração, uma vez que o tratamento com as células foi feito nos períodos iniciais da resposta autoimune.

Apesar de muitos trabalhos corroborarem com nossos resultados e mostrarem o potencial das MSCs como forma de terapia celular no diabetes tipo 1, alguns trabalhos utilizando MSCs não obtiveram o mesmo êxito. Urbán e colaboradores (2008) mostraram que a administração de MSCs (singênica/alógena) não reverteu a hiperglicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos (indução por STZ) e, somente a administração de MSCs em associação com células totais da medula óssea (BMCs) foi capaz de reverter a doença. No entanto, os

autores testaram a infusão de MSCs contendo somente 1×10^5 células, concentração muito inferior da utilizada nos demais trabalhos da literatura. O melhor resultado foi obtido quando se utilizou uma única injeção contendo 1×10^5 de MSCs + 1×10^6 de BMCs, sugerindo cooperação das duas células tronco na regeneração pancreática. Outro estudo que mostrou que a infusão de MSCs não reverteu a hiperglicemia de camundongos diabéticos foi recentemente publicado por Ezquer e colaboradores (2009), no qual os pesquisadores induziram o diabetes em camundongos C57/Bl6 através de uma única dose de STZ (200mg/dl), causando desta forma uma rápida e intensa destruição das células beta pancreáticas. Neste estudo, os pesquisadores administraram duas doses de $0,5 \times 10^6$ células nos períodos de 30 e 51 dias após a indução da doença, e observaram que os animais permaneceram hiperglicêmicos e com as ilhotas pancreáticas reduzidas mesmo após a infusão das células. Os autores justificam que os transplantes não funcionaram pois trata-se de um modelo não-imunológico, e sim exclusivamente tóxico, sugerindo que o sucesso da terapia com MSCs depende da etiologia da doença, ou seja, o mecanismo pelo qual as células beta foram destruídas.

Nossos resultados enfatizam a propriedade de baixa imunogenicidade das MSCs, uma vez que essas células puderam ser transplantadas de forma xenogênica em camundongos imunocompetentes. O único trabalho que utilizou MSCs humanas indiferenciadas como tratamento em camundongos diabéticos foi publicado por Lee e colaboradores (2006), no entanto, os animais utilizados nos experimentos eram imunodeficientes severos (da linhagem NOD/scid). Outros trabalhos na literatura têm mostrado essa propriedade das MSCs com potencial efeito terapêutico em diversas doenças. Em 2005, um trabalho mostrou que a infusão de MSCs humanas derivadas de tecido adiposo induziu a expressão de distrofina em camundongos com distrofia muscular de Duchenne *mdx* imunocompetentes. Essas células não foram rejeitadas mesmo 6 meses após o transplante (Rodriguez et al., 2005). Num estudo de 2008, foi demonstrado que a administração de MSCs humanas (derivadas de tecido adiposo) em camundongos com distrofia muscular Sjl na ausência de imunossupressão, aumentou a expressão de proteínas musculares humanas nos camundongos tratados. Essas células não foram rejeitadas após administração sistêmica, tiveram a capacidade de promover sua fusão com as células musculares do camundongo e de expressar quantidades significativas de proteínas musculares humanas, o que resultou em uma melhora da capacidade motora dos animais tratados (Vieira et al., 2008). Em seguida, outro estudo demonstrou que MSCs humanas derivadas de polpa dentária foram capazes de induzir uma melhora clínica em cachorros com distrofia muscular de Duchenne. Nesse trabalho, foram detectadas fibras musculares quiméricas e não foi observado nenhum sinal de rejeição imune das MSCs

humanas infundidas, sugerindo que a infusão das MSCs humanas pode ser feito sem a necessidade de imunossupressão (Kerkis et al., 2008). Em modelo de encefalomielite experimental (EAE), Bai e colaboradores (2009) mostraram que MSCs humanas derivadas de medula (3×10^6 células) injetadas na veia caudal de camundongos C57BL/6 imunizados com MOG ou PLP, promoveram diminuição do escore clínico da doença, aumento de oligodendrócitos no local da injúria, além de modular a resposta imune através da diminuição do padrão de resposta Th1 e Th17 (diminuição IFN- γ e IL-17) e aumento do padrão Th2 (aumento IL-4). Em estudo semelhante, Gordon e colaboradores (2009) injetaram MSCs humanas (1×10^6 células) via intraperitoneal em camundongos C57/Bl6 imunizados com MOG, e também observaram melhora significativa dos animais tratados com as MSCs.

Desta forma, nossos e outros resultados presentes na literatura enfatizam o imenso potencial terapêutico da utilização das MSCs em diversas doenças, sem a necessidade de imunossupressão constante.



6. *Conclusões*

6. Conclusões

I) Quanto à caracterização das células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 no modelo de diabetes quimicamente induzido por STZ:

- A progressão do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas após administração das múltiplas doses de STZ esteve diretamente correlacionada com a perda da massa de células beta produtoras de insulina e paralelamente aumento da massa de células alfa produtoras de glucagon;
- Não observamos alterações na quantidade de células T reguladoras Foxp3⁺ e células T produtoras de IL-17 presentes no baço dos animais tratados com STZ em todos períodos analisados, sugerindo que o tratamento com STZ não surtiu nenhum efeito sistêmico sobre essas populações celulares;
- A expressão das moléculas reguladoras CTLA-4, GITR e PD-1 esteve diminuída na superfície das células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺) do baço dos animais tratados com STZ nos primeiros estágios analisados da progressão do diabetes;
- Nestes estágios iniciais de desenvolvimento do diabetes observamos um aumento na quantidade de células T produtoras de IL-17 e células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nos linfonodos pancreáticos dos animais tratados com STZ. No entanto, a concentração de IL-17 no homogenato pancreático esteve semelhante nos dois grupos de animais estudados, sugerindo que as células Th17 e Tc17 não devem participar diretamente do processo destrutivo das células beta, mas devem ficar, preferencialmente, retidas nos linfonodos pancreáticos dirigindo e amplificando a resposta imune;
- No período de seis dias após a indução do diabetes observamos concentrações aumentadas de IL-6, TNF- α e IFN- γ no homogenato pancreático dos camundongos tratados com STZ, sugerindo uma resposta imune do padrão Th1;
- Nos períodos mais tardios de progressão da doença, houve um aumento na expressão das moléculas CTLA-4, GITR e PD-1 na superfície das células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺) no

baço dos animais tratados com STZ, sugerindo uma possível fase de regulação da resposta imune;

- No período de vinte e cinco dias após tratamento com STZ, os animais apresentaram um aumento nos níveis de IL-10 no homogenato pancreático em comparação aos animais controles, reforçando a idéia de que nesses períodos mais tardios de progressão da doença a resposta imune estaria sendo controlada e finalizada.

II) Quanto ao potencial terapêutico das MSCs humanas no tratamento do diabetes experimental:

- Quatro meses (120 dias) após as infusões de MSCs humanas, os animais que responderam ao tratamento apresentaram reversão da hiperglicemia, ou seja, apresentaram níveis normais de glicose no sangue;

- As ilhotas pancreáticas dos animais tratados com MSCs humanas mostraram-se maiores, mais densas e com morfologia típica em comparação aos animais que não receberam o tratamento com MSCs;

- A massa de células beta produtoras de insulina mostrou-se maior e mais densa nos animais que responderam ao tratamento com MSCs humanas em comparação aos animais não tratados, sugerindo uma possível regeneração dessas células em virtude do tratamento utilizado;

- A massa de células alfa produtoras de glucagon dos animais que responderam ao tratamento com MSCs humanas apresentou-se com localização e densidade semelhante aos animais selvagens, ao contrário dos animais diabéticos que não receberam o tratamento com MSCs, nos quais as células alfa mostraram-se desorganizadas e bastante aumentadas;

- A eficiência do tratamento de camundongos C57BL/6 diabéticos com MSCs humanas sugere que essas células podem ser transplantadas de forma não restrita ao MHC, ou seja, de forma alogênica ou até mesmo xenogênica, evidenciando dessa forma, seu imenso potencial como ferramenta terapêutica.



7. Referências

7. Referências

Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008. 57(7):1759-67.

Aggarwal, S.; Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005. 105(4):1815-22.

Alonso, N., Soldevila, B., Sanmartí, A., Pujol-Borrell, R., Martínez-Cáceres, E. Regulatory T cells in diabetes and gastritis. *Autoimmunity Reviews* 8. 2009. 659–662

Anderson, M. S.; Bluestone, J.A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. 23:447-85.

Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 2004. 199(10):1401-8.

Atkinson, M. A.; Eisenbarth, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001. 358(9277):221-9.

Baecher-Allan, C.; Hafler, D. A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006. 212:203-16.

Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, Miller RH. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009. 15;57(11):1192-203.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002. 30(1):42-8

Bending D, De La Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A. J Clin Invest. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. 2009.

Bennett, C. L.; Christie, J.; Ramsdell, F.; Brunkow, M. E.; Ferguson, P. J.; Whitesell, L.; Kelly, T. E.; Saulsbury, F. T.; Chance, P. F.; Ochs, H. D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001. 27(1):20-21

Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009. 1176:101-17

- Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T. B.; Oukka, M.; Weiner, H. L.; Kuchroo, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006. 441(7090):235-8.
- Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007. 8(4):345-50.
- Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2009. 21(6):612-8.
- Boumaza I, Srinivasan S, Witt WT, Feghali-Bostwick C, Dai Y, Garcia-Ocana A, Feili-Hariri M. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. *J Autoimmun*. 2009. 32(1):33-42.
- Brodie GM, Wallberg M, Santamaria P, Wong FS, Green EA. B cells promote intra-islet CD8 cytotoxic T lymphocyte survival to enhance type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008. 57:909–17.
- Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M. *Nat Immunol*. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. 2007. 8(9):958-66.
- Brunkow, M. E.; Jeffery, E. W.; Hjerrild, K. A.; Paepker, B.; Clark, L. B.; Yasayko, S. A.; Wilkinson, J. E.; Galas, D.; Ziegler, S. F.; Ramsdell, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001. 27(1):68-73.
- Chabaud, M.; Durand, J. M.; Buchs, N.; Fossiez, F.; Page, G.; Frappart, L.; Miossec, P. Human interleukin-17: A T cell derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 1999. 42(5):963-970.
- Chen J, Liu X. The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications. *Cell Immunol*. 2009. 254(2):85-90.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med*. 2003. 198, 1875–1886
- Ciric B, El-behi M, Cabrera R, Zhang GX, Rostami A. IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. *J Immunol*. 2009. 1;182(9):5296-305.
- Colter DC, Class R, Digirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. 97:3213- 8.

- Cooke, A. Th17 cells in inflammatory conditions .The review of diabetic studies. 2006. 3:72-75
- Corthay A. How do regulatory T cells work? Scand J Immunol. 2009. 70(4):326-36
- Covas, D.T. Células tronco mesenquimais. In. Zago, M.A.; Covas, D.T. Células-tronco: A nova fronteira da medicina. Ed. Atheneu. 2006.
- Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. Clin Exp Immunol. 2010. 159(2):109-19. Epub 2009 Nov 11
- Curotto de Lafaille, M. A.; Lino, A. C.; Kutchukhidze, N.; Lafaille, J. J. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. J. Immunol. 2004. 173(12):7259-7268.
- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB..In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2008. 26(9):2287-99.
- Daneman, D. Type 1 diabetes. Lancet. 2006. 367(9513):847-58
- Danke, N. A.; Koelle, D. M.; Yee, C.; Beheray, S.; Kwok, W. W. Autoreactive T cells in healthy individuals. J. Immunol. 2004.172:5967–5972.
- Das, J., Ren, G., Zhang, L., Roberts, A.I., Zhao, X., Bothwell, A.L.M., Kaer, L.V., Shi, Y., Das, G. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. JEM. 2009. vol.206, n.11, 2407-2416
- Deng W, Han Q, Liao L, You S, Deng H, Zhao RC. Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice. DNA Cell Biol. 2005. 24(7):458-63.
- Di Nicola, M.; Carlo-Stella, C.; Magni, M.; Milanese, M.; Longoni, P. D.; Matteucci, P.; Grisanti, S.; Gianni, A. M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002. 99(10):3838-43.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C.; Krause, D. S.; Deans, R. J.; Keating, A.; Prockop, D. J.; Horwitz, E. M . Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006. 8 (4)315-317
- Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. Proc Natl Acad Sci USA. 2007. 104:5115-20

- Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2009. 58(6):1302-11.
- Ezquer F, Ezquer M, Simon V, Pardo F, Yañez A, Carpio D, Conget P. Endovenous administration of bone-marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells prevents renal failure in diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009. 15(11):1354-65.
- Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yañez AJ, Conget PA. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2008. 14:631-640
- Fiorina, P., Jurewicz, M., Augello, A., Vergani, A., Dada, S., La Rosa, S., Selig, M., Godwin, J., Law, K., Placidi, C., Smith, R.N., Capella, C., Rodig, S., Adra, C.N., Atkinson, M., Sayegh, M.H., Abdi, R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *The Journal of Immunology*. 2009. 183: 993–1004
- Fontenot J.D; Rudensky A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005. 6(4):331-337.
- Fontenot, J. D.; Rasmussen, J. P.; Williams, L. M.; Dooley, J.L.; Farr, A. G.; Rudensky, A. Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*. 2005. 22(3):329-341.
- Fukuda K, Tesch GH, Nikolic-Paterson DJ. c-Jun amino terminal kinase 1 deficient mice are protected from streptozotocin-induced islet injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008. 15;366(3):710-6.
- Furlani, D. et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? *Microvascular Research* Volume 77, Issue 3, May 2009, Pages 370-376
- Gagnerault MC, Luan JJ, Lotton C, Lepault F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med*. 2002. 5;196(3):369-77.
- Gao, J., Dennis, J.E., Muzic, R.F., Lundberg, M. The dynamic distribution of bone marrow derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues and Organs*, 2001. 169:12-20
- Gillespie, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *C.M.A.J.* 2006. 175(2):165-70
- Gordon D, Pavlovska G, Glover CP, Uney JB, Wraith D, Scolding NJ. Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. *Neurosci Lett*. 2008. 19;448(1):71-3.
- Gysemans C, Callewaert H, Overbergh L, Mathieu C. Cytokine signalling in the beta-cell: a dual role for IFN γ . *Biochem Soc Trans*. 2008. 36(Pt 3):328-33

- Harrington, L. E.; Mangan, P. R.; Weaver, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr. Opin. Immunol.* 2006. 18(3):349-56.
- Herold KC, Vezys V, Sun Q, Viktora D, Seung E, Reiner S, Brown DR. Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. *J Immunol.* 1996. 1;156(9):3521-7
- Holstad M, Sandler S. A transcriptional inhibitor of TNF-alpha prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice. *J Autoimmun.* 2001. 16(4):441-7.
- Holstad M, Sandler SA transcriptional inhibitor of TNF-alpha prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice.. *J Autoimmun.* 2001. 16(4):441-7.
- Horai. R., Muelle,r K.L, Handon, R.A, et al. Requirements for selection of conventional and innate T lymphocyte lineages. *Immunity.* 2007. 27:775-785.
- Hori, S.; Sakaguchi, S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2004. 6(8):745-51.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005. 7(5):393-5.
- Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, Hünig T, Mittrücker HW, Brüstle A, Kamradt T, Lohoff M. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol.* 2009. 39(7):1716-25..
- Hussain, M. A.; Theise, N. D. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet.* 2004. 364(9429):203-5
- Itoh, N.; Hanafusa, T.; Miyazaki, A.; Miyagawa, J.; Yamagata, K.; Yamamoto, K.; Waguri, M.; Imagawa, A.; Tamura, S.; Inada, M.; Kawata, S.; Tarui, S.; Kono, N.; Matsuzawa, Y. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J. Clin Invest.* 1993. 92(5):2313-2322.
- Ivanov, I. I.; McKenzie, B. S.; Zhou, L.; Tadokoro, C. E.; Lepelley, A.; Lafaille, J. J.; Cua, D. J.; Littman, D. R. The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells *Cell.* 2006. 22;126(6):1121-33
- Kébir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A. *Nat Med.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. 2007. 13(10):1173-5.

- Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, Cabral RM, Maranduba CM, Gaiad TP, Morini AC, Vieira NM, Brolio MP, Sant'Anna OA, Miglino MA, Zatz M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med.* 2008. 3;6:35
- Kikly, K.; Liu, L.; Na, S.; Sedgwick, J. D. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 2006. 18(6):670-5.
- Klinke, D. J. extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. *PLoS ONE.* 2008. 3: e1374
- Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 2008. 7(7):550-7.
- Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004. 21(4):467-76.
- Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007. 13(4):423-31.
- Korn, T., Betteli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 cells. *The annual review of immunology.* 2009. 27:485-517
- Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?. *Diabetes.* 2005. 54 Suppl 2:S114-24.
- Kronenberg, M.; Rudensky, A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature.* 2005. 435(7042):598-604.
- Kryczek I, Wei S, Vatan L, Escara-Wilke J, Szeliga W, Keller ET, Zou W. Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17⁺ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J Immunol.* 2007. 1;179(3):1423-6.
- Lafaille, M.A.C.; Lafaille, J.J. Natural and Adaptive Foxp3⁺ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* 30. May 22, 2009.
- Le Blanc, K.; Ringden, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005. 11(5):321-34.
- Le Blanc, K.; Tammik, L.; Sundberg, B.; Haynesworth, S. E.; Ringden, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 2003. 57(1):11-20

- Lee, R. H.; Seo, M. J.; Reger, R. L.; Spees, J. L.; Pulin, A. A.; Olson, S. D.; Prockop, D. J. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc.Natl.Acad.Sci .U S A*. 2006. 103(46):17438-43
- Lehner T.Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation.. *Immunology*. 2008. 123(1):40-4
- Li Z, Karlsson FA, Sandler S. Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *J Endocrinol*. 2000. 165(1):93-9.
- Lin P, Chen L, Yang N, Sun Y, Xu YX. Evaluation of stem cell differentiation in diabetic rats transplanted with bone marrow mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2009. 41(5):1891-3.
- Lock, C.; Hermans, G.; Pedotti, R.; Brendolan, A.; Schadt, E.; Garren, H.; Langer-Gould, A.; Strober, S.; Cannella, B.; Allard, J.; et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med*. 2002. 8:500-508.
- Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009. 3(5):1004-11.
- Lu,L., Cantor, H. Generation and Regulation of CD8⁺ Regulatory T Cells. *Cellular & Molecular Immunology*. 2008. 5(6) 400-407
- Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005. 90(4):516-25.
- Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, Thivolet C. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia*. 2009. 52(7):1391-9.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C.T.) Transforming growth factor- β induces development of the T_H17 lineage. *Nature*. 2006. 441, 231-234
- Martinez GJ, Nurieva RI, Yang XO, Dong C Regulation and function of proinflammatory TH17 cells.. *Ann N Y Acad Sci*. 2008. 1143:188-211.
- Martin-Orozco,N., Chung, Y., Chang, S.H., Yi-Hong Wang., Dong, C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur. J. Immunol*. 2009. 216 - 39: 216–224
- Mathis, D.; Vence, L.; Benoist, C. Beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*. 2001. 414(6865):792-798.

- Matusevicius, D.; Kivisakk, P.; He, B.; Kostulas, N.; Ozenci, V.; Fredrikson, S.; Link, H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 1999. 5:101-104.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 2005. 1;175(5):3025-32.
- Mensah-Brown, E. P.; Shain, A.; Al-Shamisi, M.; Wei, X.; Lukic, M. L. IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. *Eur. J. Immunol.* 2006. 36(1):216-223
- Mensah-Brown, E.P.K.; Shain, A., Parekh, K., Al Hakin, A., Al Shamisi, M., HSU, D.K., Lukic, M.L. Functional Capacity of Macrophages Determines the Induction of Type 1 Diabetes *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. 1084: 49–57.
- Monteleone, G.; Pallone, F.; Macdonald, T.T. Interleukin-21 (IL-21)-mediated pathways in T cell-mediated disease *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20. 2009. 185–191
- 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. *Immunobiol.* 2002. 205, pp. 35–50
- Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007. 15;110(10):3499-506.
- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2006b. 15;177(4):2080-7.
- Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006a. 15;108(6):2114-20.
- Nocentini G, Riccardi C. GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol.* 2005. 35(4):1016-22.
- Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi CGITR/GITRL: more than an effector T cell costimulatory system. *Eur J Immunol.* 2007. 37(5):1165-9.
- Notkins, A.L. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J. Biol. Chem.* 2002. 277(46):43545-8.
- Ono M, Shimizu J, Miyachi Y, Sakaguchi S. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein (high), Foxp3-expressing CD25+ and CD25- regulatory T cells. *J Immunol.* 2006. 176(8):4748-56

- O'Reilly LA, Gu D, Sarvetnick N, Edlund H, Phillips JM, Fulford T, Cooke A. alpha-Cell neogenesis in an animal model of IDDM. *Diabetes*. 1997. 46(4):599-606
- Pakala SV, Chivetta M, Kelly CB, Katz JD. In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1999. 189(7):1053-62
- Palmer, J. P.; Fleming, G. A.; Greenbaum, C. J.; Herold, K. C.; Jansa, L. D.; Kolb, H.; Lachin, J. M.; Polonsky, K. S.; Pozzilli, P.; Skyler, J.; Steffes, M. W. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function. *Diabetes*. 2004. 53(1): 250-264
- Paust, S. Cantor, H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunological reviews*. 2005. 204: 195-207
- Peterson JD, Pike B, McDuffie M, Haskins K. Islet-specific T cell clones transfer diabetes to nonobese diabetic (NOD) F1 mice. *J Immunol*. 1994. 153(6):2800-6
- Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999. 284(5411):143-7.
- Randolph, D. A.; Fathman, C. G. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med*. 2006. 57:381-402.
- Rodriguez, A.M; Pisan, D.; Dechesne, C.A; Turc-Carel, C.; Kurzenne, J.; Wdziekonski, B.; Villageois, A.; Bagnis, C.; Dani, C. Transplantation of multipotent cell population from adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *JEM*. 2005. vol.201.1397-1405.
- Roep, B. O. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*. 2003. 46(3):305-321.
- Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol*. 2007. 7(8):585-98
- Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol*. 2009 Sep;39(9):2331-6.
- Sakaguchi, S. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr. Opin. Immunol*. 2000. 12(6):684-90
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol*. 2004. 22:531-62

- Sakaguchi, S.; Masahiro, O.; Setoguchi, R.; Yagi, H.; Hori, S.; Fehervari, Z.; Shimizu, J.; Takahashi, T.; Nomura, T. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews*. 2006. 212: 8–27
- Salomon, B.; Lenschow, D. J.; Rhee, L.; et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000. 12:431–40.
- Santarasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, Liotta F, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol*. 2009.;39(1):207-15.
- Schrepfer, S. et al. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier. *Transplantation Proceedings*. 2007. 39, 573–576
- Shevach EM, Stephens GL. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol*. 2006. 6(8):613-8
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002. 3(2):135-42.
- Stummvoll GH, DiPaolo RJ, Huter EN, Davidson TS, Glass D, Ward JM, Shevach EM. Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. *J Immunol*. 2008. 1;181(3):1908-16.
- Sury-Payer, E.; Fritzsching, B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin. Immun.* 2006. 28:3-16.
- Tesch, G. H.; Nikolic-Paterson, D. J. Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy. *Nephron. Exp. Nephrol*. 2006. 104:e57–e62
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006. 36(10):2566-73.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008. 8(9):726-36
- Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Góczy E, Vas V, Monostori E, Uher F. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells*. 2008. 26(1):244-53.
- Vaknin-Dembinsky, A.; Balashov, K.; Weiner, H. L. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J. Immunol*. 2006. 176:7768-7774.

van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007. 23:169-83.

Veldhoen, M et al., "TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells," *Immunity*. 2006. 24(2): 179-89

Veldman C, Pahl A, Beissert S, Hansen W, Buer J, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Inhibition of the transcription factor Foxp3 converts desmoglein 3-specific type 1 regulatory T cells into Th2-like cells. *J Immunol*. 2006. 1;176(5):3215-22

Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Jazedje T, Secco M, Nunes VA, Strauss BE, Vainzof M, Zatz M. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol Cell*. 2008. 100(4):231-41.

Volpe E, Touzot M, Servant N, Marloie-Provost MA, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood*. 2009. 22;114(17):3610-4.

Voltarelli, J.C.; Couri, C. E. B.; Stracieri, A.B.P.L.; Oliveira, M.C.; Morais, D.A.; Pieroni, F.; Coutinho, M.; Malmegrim, K.C.R.; Foss-Freita, M.C.; Simões, B.P.; Foss, M.C.; Squiers, E.; Burt, R.K. Autologous nonmyeloblastic hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2007. 297(14) 1568-1576.

von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005.6(4):338-44

Wahl, S.M., Chen, W. Transforming growth factor-induced regulatory T cells referee inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Research & Therapy*. 2005. Vol 7 No 2

Waldron-Lynch, F.; Herold, K.C. Advances in Type 1 diabetes therapeutics: Immunomodulation and beta cell salvage. *Endocrinol Metab Clin N Am* 38. 2009. 303–317

Walker LS. Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology*. 2009. 126(4):466-74

Walker, M. R.; Kasprovicz, D. J.; Gersuk, V. H.; Benard, A.; Van Landeghen, M.; Buckner, J. H.; Ziegler, S.F. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. 2003. 112(9):1437-1443.

Wu, A. J.; Hua, H.; Munson, S. H., et al. Tumor necrosis factor- α regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. 99:12287–92.

Xiu Y, et al. B lymphocytes depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in NOD mice despite isotype-specific differences in Fc γ R effector functions. *J Immunol*. 2008. 180:2863–2875.

- Xu YX, Chen L, Wang R, Hou WK, Lin P, Sun L, Sun Y, Dong QY. Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanisms. *Med Hypotheses*. 2008. 71(3):390-3.
- Yanaba, K.; Bouaziz, J.D, Matsushita, Y.; Magro, C.M.; E. St.Clair, W.; Tedder, T.F. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease *Immunological Reviews*. 2008. Vol. 223: 284–299
- Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Stem Cells. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. 2006. 24(11):2582-91.
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., Dong, C. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells *Biol. Chem*. 2007. 282 (13): 9358-9363
- Yen HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg MV, Liang KL, Bruno TC, Pyle KJ, Chan SL, Anders RA, Trimble CL, Adler AJ, Lin TY, Pardoll DM, Huang CT, Drake CG. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol*. 2009. 1;183(11):7161-8.
- Yoon, J.W., Jun, H.S. Cellular and Molecular Pathogenic Mechanisms of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Annals New York Academy of Sciences*. 2001
- Zhang, J.; Li, Y.; Chen, J.; Cui, Y.; Lu, M.; Elias, S. B.; Mitchell, J. B.; Hammill, L.; Vanguri, P.; Chopp, M. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp. Neurol*. 2005 . 195(1):16-26.
- Zhao W, Wang Y, Wang D, Sun B, Wang G, Wang J, Kong Q, Wang Q, Peng H, Jin L, Li H. TGF-beta expression by allogeneic bone marrow stromal cells ameliorates diabetes in NOD mice through modulating the distribution of CD4+ T cell subsets. *Cell Immunol*. 2008. 253(1-2):23-30
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol*. 2006. 176, 3321–3329.
- Zheng, Y., and Rudensky, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol*. 2007. 8, 457–462
- Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*. 2008. 8;453(7192):236-40.
- Zou XL, Zhao ZY, Wang YY, Su ZQ, Xiang M. Diabetogenic T cells induce autoimmune diabetes in BALB/c mice. *Chin Med Sci J*. 2008. 23(2):88-94



8. Anexo

8. Anexo

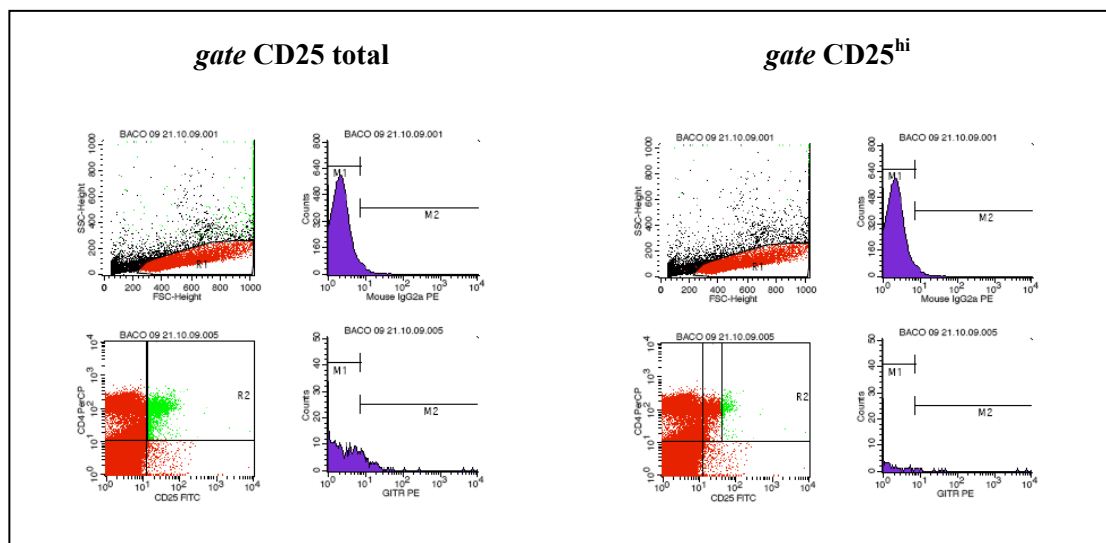


Figura I. *Dot plot* e histogramas representativos da análise das moléculas expressas na superfície das células T $CD4^+CD25^+$ e T $CD4^+CD25^{hi}$. Primeiramente foi desenhada uma *gate* (R1) na população de linfócitos, com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por parâmetros de granularidade (SSC). Em seguida, os eventos da *gate* de linfócitos (R1) foram analisados para marcação com os diferentes anticorpos por *dot plots* de fluorescência 1 (CD4), por fluorescência 2 (CD25). Em seguida foi desenhada uma “*gate*” R2 na população duplo-positiva. A marcação de fluorescência 3 (CTLA-4, GITR, PD-1 ou Foxp3) na *gate* R2 foi representada por um histograma de FL3.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 067/2007, sobre o projeto intitulado “*Células T reguladoras e Th17 no controle da imunidade contra infecções, tumores e doenças auto-imunes*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor João Santana da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **30 de julho de 2007**.

(We certify that the protocol nº 067/2007, about “*Regulating T cells and Th17 in the control of the immunity against infections, tumors and disease autoimmune*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **07/30/2007** meeting).

Ribeirão Preto, 1º de agosto de 2007.

Prof. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE-MAFFEI
Presidente, em exercício, da Comissão de Ética
em Experimentação Animal, em exercício

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)