

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

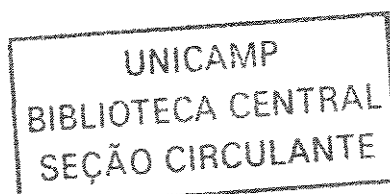
**Rika Ashimine**

**Efeitos da Administração da Testosterona na  
Incidência do Diabetes e Sobre a Expressão Gênica  
de Citocinas no Pâncreas e Células Esplênicas em  
Camundongos Fêmeas da Linhagem NOD/Uni**

Dissertação apresentada ao Curso de  
pós-graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção  
do Título de Mestre em Clínica Médica  
na área de Ciências Básicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Campinas - 2004



UNIVERSIDADE DE BC  
NOME AMADA UNICAMP  
As35e  
EX  
O BC/ 64792  
16.10.00086.05  
D  
D 11.00  
20/07/05  
D  
D id 358515

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

As35e      Ashimine, Rika  
Efeitos da administração da testosterona na incidência do diabetes e sobre a expressão gênica de citocinas no pâncreas e células esplênicas em camundongos fêmeas da linhagem NOD/Uni. / Rika Ashimine. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner  
Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Camundongo. 2. Citocinas. 3. Diabetes Mellitus. 4. Testosterona. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner**

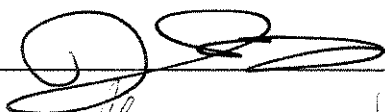
---

---

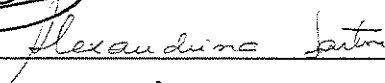
**Membros:**

---

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner



Profa. Dra. Alexandrina Sartori



Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann



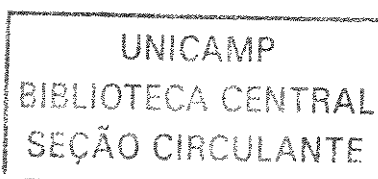
---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

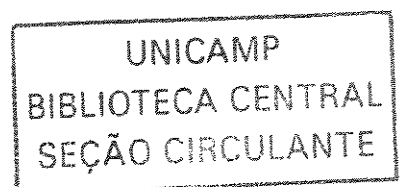
---

**Data: 30/08/2004**

---



**À minha família e aos amigos, a base da minha existência,  
pelo carinho, amizade, apoio, compreensão e  
cumplicidade em todos os momentos.**



## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela oportunidade, confiança, orientação e incentivo à pesquisa

As Profas Dras. Alexandrina Sartori e Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann por aceitarem compor a banca examinadora e pelas valiosas discussões e sugestões para a composição dessa tese.

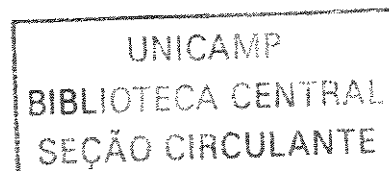
A Luís Henrique Barbosa Boechat pela prontidão em aceitar a suplência da banca examinadora, pela amizade e incentivo.

A minha família pelo apoio, carinho, compreensão e incentivo.

A Conceição Aparecida Vilella que me recebeu de braços abertos quando tudo era incertezas e ansiedades, pela amizade verdadeira, confiança, paciência, palavras de conforto, conselhos, plantões no laboratório. Pelo exemplo de garra, determinação e dedicação ao trabalho .

A Margarida Melo (Meg), pelo cuidado com os animais desde o primeiro momento, pela amizade, exemplo de determinação e humanidade, palavras de conforto e encorajamento.

A Gláucia e Maira, minhas companheiras de luta, minhas amigas que me estenderam as mãos nos momentos bons e ruins, sempre me apoiando, ajudando (principalmente nas artes gráficas e no uso do computador). Pela paciência e dedicação, as horas extras no laboratório, os conselhos, as palavras amigas de conforto e consolo nas horas mais difíceis. Por terem mostrado que apesar de todas essas etapas ( que fazem parte do protocolo) curtir um "happy hour" de vez em



quando e jogar conversa fora é uma das melhores maneiras de aproveitar a vida sem muito estresse.

A Bruna e Carina, as mais "velhas" da new generation, Karla (com K), Leonardo (vulgo Leoptina), Priscila, Rhubia e Thiago (com Th) agradeço pela amizade, pelos momentos de descontração, cumplicidade, pelas participações diretas e indiretas e principalmente, por serem pessoas únicas e verdadeiras.

A Maria Júlia pela amizade, pela disposição em me ajudar, pelas conversas filosóficas que me ajudaram a dar valor às pequenas coisas da vida.

A Letícia, pela sua dedicação e empenho, pela ajuda nas etapas deste trabalho e pela sua amizade.

A Ana Paula Perroud, por sua amizade, alegria contagiante, os conselhos, palavras de incentivo e apoio.

A Ivone pela amizade sincera, apoio, "alto astral" e bom humor.

Aos ex aprimorandos Gilvandro, Bethânia e Marcelo que me ajudaram de forma direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos Profs Drs. Lício Augusto Velloso e Mário Abdala Saad pela orientação e uso das instalações de seu laboratório, onde realizei inúmeros protocolos de "imunoblotting".

Ao Sr. Luís, técnico do laboratório de Fisiologia e Metabolismo / FCM e aos alunos dos Profs Lício Velloso e Mário Saad pelo empréstimo de materiais e ajuda nos procedimentos de "immunoblotting".

A Laurione, Davi e Cíntia, funcionários do Laboratório de Patologia Clínica - HC/ UNICAMP, pelo uso da instalação do laboratório e do equipamento para dosagem sérica de testosterona .

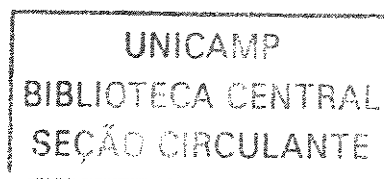
Aos Profs Gentil Alves Filho e Marilda Mazzali do Laboratório de Nefrologia/FCM, Profs Áureo Yamada e Paulo Juazeiro Laboratório de Histologia/IB por permitirem o uso do microscópio para captação de imagens

A Renata Maia, secretária da Comissão de Pós-Graduação/FCM, pela paciência, disposição e prontidão em ajudar nos momentos de sufoco.

Ao Eduardo Odone, secretário da Pós Graduação /Departamento de Clínica Médica, pela disposição e paciência.

Aos animais que deram as vidas para a realização deste trabalho.

Ao CAPES pela concessão da bolsa.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
1.1. O DIABETES MELLITUS	13
1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES ESPONTÂNEO AUTO-IMUNE	16
1.2.1 RATOS BIO-BREEDING (BB)	16
1.2.2. CAMUNDONGO NOD (DIABÉTICO NÃO OBESO)	17
1.3. ESTERÓIDES SEXUAIS E DOENÇAS AUTOIMUNES	21
1.4. ESTERÓIDES SEXUAIS E CAMUNDONGOS NOD	22
1.5. IMUNOREGULAÇÃO, CITOCINAS E DESTRUIÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	24
1.6. JANUS-QUINASE (JAKs) - TRANSDUTORES DE SINAIS E ATIVADORES DE TRANSCRIÇÃO (STATs) PARA CITOCINAS.	27
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1. ANIMAIS	34
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS	34
3.3. DIAGNÓSTICO DO DIABETES E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	36
3.4. DOSAGEM DE TESTOSTERONA	38
3.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA	38
3.6. IMUNOISTOQUÍMICA	41
3.7. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO:	42
3.8. ANÁLISE DA LINFOPROLIFERAÇÃO ATRAVÉS DE ENSAIO COM MTT	42
3.9. CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO E ESTÍMULOS	43
3.10. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (RNAT)	43
3.11. ANÁLISE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO	44
3.12. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA TOTAL EXTRAÍDO (cDNA)	45
3.13. AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	45
3.14. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	46
3.14. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DO RNA MENSAGEIRO	47
3.15. PREPARO DO EXTRATO DE BAÇO (AVALIAÇÃO DA VIA JAK – STAT)	48
3.16. IMUNOPRECIPITAÇÃO E IMMUNOBLOTTING	49
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>51</b>
4.1. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO E FREQUÊNCIA DO TRATAMENTO COM PROPIONATO DE TESTOSTERONA NO NÍVEL PLASMÁTICO	52
4.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA TESTOSTERONA NA MANIFESTAÇÃO DO DIABETES E DESTRUIÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	52
4.3. IMUNOISTOQUÍMICA	57
4.4. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE TESTOSTERONA SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO PÂNCREAS E CÉLULAS ESPLÊNICAS IN VIVO:	61
4.4.1. PÂNCREAS:	61
4.4.2. CÉLULAS ESPLÊNICAS:	65
4.5. ENSAIO DE VIABILIDADE	69



<b>4.6.EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE TESTOSTERONA SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS NAS CÉLULAS ESPLÊNICAS IN VITRO:</b>	<b>69</b>
<b>4.7. ATIVAÇÃO DA VIA JAK-STAT</b>	<b>70</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>82</b>

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

5DHT	5- $\alpha$ diidrotestosterona
APC	Células apresentadoras de antígeno
AR	Receptor de andrógeno
BB	Bio-breeding
CD	Cluster designation
cDNA	Dna complementar
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
Cf	Grupo controle fêmea
CFA	Adjuvante completo de Freund
Cm	Grupo controle macho
ConA	Concanavalina A
DEPC	Dietilpirocarbamato
DM-1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM-2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídio tri-fosfato
ECLIA	Electrochemiluminescence immunoassay
GABA	Ácido aminobrutírico gama
GAD	Glutamato descarboxilase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HSP 65	Proteína de choque térmico 65
ICA	Islet cells antibodies
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
Jak	Janus-quinase
JH	Jak homology
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal

---

MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolium]
NK	Natural killer
NOD	Non obese diabetic/diabético não-obeso
PTK	Proteína quinase
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa
SBF	Soro fetal bovino
SH	Src-homology
SPF	Specific pathogen free
Stat	Signal transducers and activators of transcription
Th	T auxiliar/T helper
Tm	Grupo tratado mensalmente com Testosterona (174 $\mu$ M)
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
TNF-R	Receptor de fator de necrose tumoral
Ts1	Grupo tratado semanalmente com Testosterona (174 $\mu$ M)
Ts2	Grupo tratado semanalmente com Testosterona (348 $\mu$ M)

---

## RESUMO

A insulite está presente em ambos os sexos do camundongo NOD (non obese diabetic), enquanto a incidência do diabetes tem alta prevalência em fêmeas. O diabetes manifesta-se em 90% das fêmeas e aproximadamente em 20% nos machos. Neste estudo, investigamos o efeito da testosterona na incidência do diabetes e no perfil de citocinas Th1 no pâncreas e em células esplênicas do camundongo fêmea NOD. Nós utilizamos diferentes doses *in vitro* (5, 10, 20 e 30nM) e *in vivo* (174 $\mu$ M e 348 $\mu$ M) com administração semanal e mensal. Os camundongos fêmeas foram mantidos em tratamento durante 28 semanas, iniciando na 4ª semana de vida. Para os estudos *in vivo* o tratamento semanal e mensal com 174 $\mu$ M de testosterona reduziu a incidência do diabetes em 40%, enquanto o tratamento semanal com 348 $\mu$ M reduziu a incidência do diabetes a 20%, índice semelhante ao do macho, com menor índice de insulite. No pâncreas, o perfil de citocinas Th1 estava aumentado no grupo de animais tratados diabéticos que no grupo de camundongos não diabéticos. Semelhante aos resultados do estudo *in vivo*, os efeitos da testosterona *in vitro* sobre as citocinas Th1 de células esplênicas exibiram tempo e dose-dependência. Contudo, o efeito da testosterona *in vivo* sobre a diminuição do IFN- $\gamma$  foi mais proeminente. O efeito da testosterona sobre a ativação da Stat3, Stat4, Jak2 e Tyk2 evidenciou que o estímulo a fosforilação de Jak2 e a fosforilação de Stat3 reduzida é dose-dependente. Estes resultados reforçam os efeitos da testosterona sobre a incidência do diabetes tipo 1 e sua modulação nos níveis de citocinas Th1 e na fosforilação dos fatores de transcrição no pâncreas e em células esplênicas no camundongo NOD.

## ABSTRACT

Insulinitis is present in both gender of non-obese diabetic (NOD) mice, whereas the incidence of diabetes is much higher in females; overt diabetes appears in 90% of females and approximately 20% of males. In this study, we investigated the effect of testosterone on the incidence of diabetes and the Th1 cytokine profile in pancreas and spleen cells in female NOD mice. Testosterone was employed at different doses (in vivo 174 $\mu$ M and 348 $\mu$ M; and 5, 10, 20 or 30nM in vitro) and with variable frequencies (weekly and monthly) of administration., Female mice were maintained under treatment for 28 weeks, starting from the 4<sup>th</sup> week of life. Diabetes was diagnosed by two consecutive blood glucose levels  $\geq$  250mg/dL. For in vivo studies, the weekly and monthly schedule of 174 $\mu$ M testosterone treatment reduced the incidence of diabetes to 40% whilst the weekly dose of 348 $\mu$ M reduced the incidence to 20%, an incidence similar that of male diabetes with a lower insulinitis index. In pancreas, the Th1 cytokine profile was higher in treated-diabetic than non-diabetic mice. Similarly to in vivo studies, the in vitro effects of testosterone on spleen cells Th1 cytokine were time and dose dependent. However, in vivo, decrease in IFN- $\gamma$  was more prominent. Testosterone activation of Stat3, Stat4, Jak2 and Tyk2 induced a dose dependent increase in Jak2/Py and a decrease in Stat3/Py. These results demonstrate the effect of testosterone on the incidence type 1 diabetes and its modulation of the Th1 cytokine and transcription factor phosphorylation in NOD mice.

## 1.INTRODUÇÃO

---

## **1.1. O Diabetes Mellitus**

O *diabetes mellitus* é definido como desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por hiperglicemia crônica, que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999), resultante do déficit de produção e/ou ação da insulina. Considerando-se as características etiológicas do diabetes mellitus e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em dois tipos: diabetes tipo 1A: auto-imune e 1B: idiopático (DM-1), e tipo 2, (DM-2) (ALBERTI & ZIMMET, 1998).

O início do DM-1 auto-imune é na maior parte das vezes, agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes (EISENBARTH, *et al.*, 1986). Nessa doença é observada infiltração mononuclear progressiva nas ilhotas pancreáticas com destruição seletiva de células  $\beta$  produtoras de insulina resultando na deficiência desse hormônio. Outras células pancreáticas do sistema endócrino, como as produtoras de glucagon (células  $\alpha$ ) ou somatostatina (células  $\delta$ ) não são afetadas (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

Diversas evidências apontam para a origem auto-imune do DM-1 (BOTTAZZO *et al.*, 1974). Os autores descrevem auto-anticorpos circulantes, denominados anticorpos anticélula da ilhota ou ICA ("islet-cell antibodies"). Os ICA são detectados precocemente antes da manifestação clínica do diabetes e são considerados marcadores imunológicos do DM-1 sem efeito patogênico direto (PALMER *et al.*, 1981).

Enfatizando-se o conceito do DM-1 em ser classificada como doença auto-imune, com seletiva destruição das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas e presença de clones auto-reativos de linfócitos T, pode-se presumir que o processo auto-imune seria decorrente da perda da tolerância de linfócitos a determinados constituintes desta célula (ROSSINI *et al.*, 1993; SCHWARTZ, 1993). Entretanto, admite-se que outros mecanismos imunopatogênicos possam estar envolvidos, tornando seu entendimento complexo. Estudos do DM-1 auto-imune em modelos animais experimentais, fortalecem a hipótese da ocorrência de desequilíbrio entre sub-populações de células T efectoras (BACH, 1994 e 1997).

A perda da tolerância imunológica no DM-1 tem sido amplamente estudada em modelos experimentais murinos, cogitando-se a existência de anormalidades da tolerância central tímica e periférica. Assim, em decorrência da falha no bloqueio, anergia e supressão periférica da reatividade anti-células  $\beta$ , ocorrem respostas que são direcionadas, coordenadas por linfócitos T  $CD4^+$  direcionadas a constituintes da células  $\beta$ , que são processados e expostos por células apresentadoras de antígenos (APC), favorecendo deste modo a manifestação do DM-1 (LAFFERTY, 1997).

Um número cada vez maior de antígenos presente nas células das ilhotas vem sendo identificado (ATKINSON *et al.*, 1992; BOTAZZO *et al.*, 1991). São eles: sialoglicolipídeo, insulina, receptor de insulina, transportador



de glicose (GLUT-2), proteína de choque térmico 65 (hsp 65), carboxipeptidase H, ICA 512/IA-2 (tyrosine phosphatase-like). A proteína glutamato descarboxilase (GAD) encontrada na membrana das células  $\beta$  é o principal marcador no DM-1, o qual converte o ácido glutâmico em ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (BAEKESKOV *et al.*, 1990; ERLANDER & TOBIN, 1991; KIM *et al.*, 2002). O GAD possui duas formas isoméricas denominadas GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>, os quais estão presentes em 85-90% dos indivíduos com DM-1 (KELLER, 1990; HARRISON *et al.*, 1992; ATKINSON *et al.*, 1992; HONEYMAN *et al.*, 1993; DURINOVICH-BELLÓ *et al.*, 1996).

Por outro lado, considera-se que a expressão de peptídeos imunogênicos na célula  $\beta$ , induzidos por toxinas e infecções virais, poderiam aumentar a suscetibilidade a reações autoimunes (BACH, 1994). Além disso, a predisposição genética do indivíduo para a destruição auto-imune, juntamente com fatores ambientais, parece favorecer o desencadeamento dos mecanismos de autoimunidade.

O papel do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na predisposição genética ao DM-1 está estabelecido com a associação de genes I<sup>A</sup> e I<sup>E</sup> com a manifestação dessa doença. Esses genes influenciam no desenvolvimento do DM-1 através da seleção positiva de clones auto-reativos no timo (presença de alelos de suscetibilidade); pela ausência de seleção negativa no timo (falta de alelos

protetores para delir clones auto-reativos) e, ainda pela ausência de anergia periférica de clones auto-reativos (gradiente de afinidade do MHC com o complexo peptídeo/TCR e ausência de linfócitos T supressores restritos ao MHC) (NEPOM & ERLICH, 1991; ATKINSON, 1997).

Diversos autores propõem que fatores variados de agressão, como citocinas liberadas pelos linfócitos T, atuem na destruição da célula  $\beta$  pancreática (CORBETT *et al.*, 1993; EIZIRIK *et al.*, 1993; POCIOT *et al.*, 1994; EIZIRIK *et al.*, 1996). Tais moléculas mediarão o processo inflamatório local, alterando a função das células  $\beta$  e contribuindo para a destruição das ilhotas pancreáticas. Entretanto, a análise da patogênese do diabetes em humanos é limitado e por essa razão é importante destacar que grande parte das informações que sustentam a hipótese da participação dos linfócitos T na imunopatogênese do DM-1 decorre de investigação de modelos animais geneticamente predispostos a essa doença, como os ratos da linhagem BB (Bio-Breeding) e os camundongos da linhagem NOD (diabético não obeso).

## ***1.2. Modelos Experimentais de Diabetes Espontâneo auto-imune***

### **1.2.1 Ratos Bio-Breeding (BB)**

O rato BB é um modelo espontâneo de diabetes auto-imune que foi descoberto no Canadá por NAKHOODA *et al.*, (1977), sendo denominado inicialmente como BB/DP (diabetes prono). Esses animais desenvolvem DM espontâneo entre 8ª e 16ª semana de vida. A frequência de manifestação ocorre tanto em machos quanto em fêmeas e a incidência da doença varia nas diversas

colônias estabelecidas no mundo, ocorrendo por volta de 40 a 70% nesses animais. O estabelecimento clínico do diabetes mellitus nos ratos BB é precedido por um período de pré-diabetes, caracterizado por insulite, onde se verifica a presença de anticorpos séricos anti-ilhota pancreática, similarmente ao que ocorre nos camundongos NOD. A infiltração de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas desses animais é constituída principalmente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, podendo-se encontrar também macrófagos e linfócitos B (SEEMAYER *et al.*, 1982).

Além disso, esses animais desenvolvem outras doenças autoimunes como a tiroidite e expressam níveis séricos elevados de auto-anticorpos órgão específicos como anti-tireoglobulina, anti-mucosa gástrica e antimúsculo liso (YALE & MARLISS, 1982).

### **1.2.2. Camundongo NOD (diabético não obeso)**

A linhagem de camundongo NOD representa modelo experimental descrito por MAKINO *et al.*, 1980, que desenvolve espontaneamente diabetes mellitus auto-imune semelhante àquele observado em humanos. Essa linhagem foi desenvolvida no Japão, após o cruzamento de uma sublinhagem CTS (propensa à catarata) com linhagem não consanguínea ICR. O primeiro relato de DM-1 espontâneo foi observado em apenas um camundongo fêmea e a partir de cruzamentos seletivos de sua prole, a linhagem NOD isogênica foi estabelecida em 1980 no Laboratório SHIONOGI ABURAHU como modelo animal para o DM-1 (MAKINO *et al.*, 1980)

A colônia NOD/Shi demonstrou prevalência de diabetes entre 70-80% para fêmeas e 20% para machos. Contudo, diferenças na manifestação do diabetes entre

diversas colônias têm sido relatadas (POZZILLI *et al.*, 1989). Fatores ambientais como dieta e exposição a vírus têm sido considerados como causa das diferenças de incidência.

No Brasil, a linhagem foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas por PAVIN & ZOLLNER (1994), a partir de colônias matrizes provenientes do laboratório INSERM U-25-Necker, Paris, França.

O DM-1 clínico neste modelo animal desenvolve-se espontaneamente entre a 16<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana de vida, mais freqüentemente em fêmeas. Polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observados nestes animais, acompanhados de uma rápida perda de peso (MAKINO *et al.*, 1980). A remissão espontânea raramente é observada com óbito dos animais diabéticos entre 4 e 8 semanas depois da manifestação do diabetes, a menos que recebam terapia de reposição com insulina. A prevalência da doença varia nas diversas colônias, entre 5 e 90% nas fêmeas e 0 e 50% nos machos. A colônia NOD estabelecida e mantida no Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresenta prevalência de diabetes entre 60-90% nas fêmeas e 5-20% nos machos.

O diabetes clínico nesses animais é precedido por uma fase pré-diabética (insulite), caracterizada pela infiltração progressiva de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas (inicialmente linfócitos T CD4<sup>+</sup> e posteriormente linfócitos T CD8<sup>+</sup>), que se inicia ao redor do primeiro mês de vida. A segunda fase é caracterizada pela destruição das células  $\beta$  produtoras de insulina e manifestação do diabetes (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

A maioria das células mononucleares infiltradas no interior das ilhotas pancreáticas é representada por linfócitos T, sub-tipo Th1. Contudo, pode-se verificar, em menor extensão, a presença de linfócitos B, macrófagos e células NK (KAY *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1997). Embora a maioria das células infiltrada seja linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> também são observados. Nesses animais, a infiltração de células mononucleares é observada nas glândulas submandibulares, lacrimais e tiróide tanto em fêmeas quanto em machos, por volta de 9 semanas de idade (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

Durante o desenvolvimento da doença no camundongo NOD células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> exercem papel sinérgico, uma vez que o diabetes apenas se desenvolverá na presença de ambos subtipos (WONG, 1997). Portanto, linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem ter papel essencial, não somente no início da insulite, como também na progressão do diabetes, uma vez que sua eliminação através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD4<sup>+</sup> pode suprimir a insulite e, conseqüentemente, o aparecimento do diabetes no camundongo NOD (SHIZURU *et al.*, 1988). Linfócitos CD4<sup>+</sup> são predominantemente observados na fase precoce da infiltração (periinsular), onde são requeridos nos processos de expansão clonal através da produção de IL-2 e, dessa forma, aumentado a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (WONG *et al.*, 1997). A proporção de células CD8<sup>+</sup> no infiltrado de células T cresce substancialmente com o tempo de destruição das células produtoras de insulina (BEDOSSA *et al.*, 1989). Entretanto, existem evidências do papel dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na fase efetora final da patogênese do diabetes, independente da presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (NAGATA *et al.*, 1994) (WONG *et al.*, 1996). Dentre os mecanismos

de destruição das ilhotas pancreáticas está a capacidade de realizar funções citotóxicas através da utilização de grânulos de perforinas e granzimas bem como indução de apoptose através da interação Fas/Fas-L (CHERVONSKY *et al.*, 1997; INGELSSON *et al.*, 1998; EIZIRIK & MANDRUP-POULSEN, 2001).

Os linfócitos T auto-reativos demonstram ter papel crucial no aparecimento do diabetes nesses animais (TISCH & McDEVITT, 1996) e a ineficiência de sua eliminação pode contribuir para a manifestação da doença. Assim, observou-se que a prevenção do DM espontâneo no camundongo NOD pode ser obtida através da timectomia neonatal. Além disso, em camundongos NOD/nude (atímicos), verifica-se redução da incidência de insulite sem manifestação do diabetes. Complementando essas observações, autores descreveram que a administração de imunossupressores com função direcionada preferencialmente para linfócitos T e administração de anticorpos anti-CD3<sup>+</sup> (HAYWARD & SCHREIBER, 1989) são capazes de suprimir a ocorrência do DM auto-imune espontâneo (O' REILLY *et al.*, 1991; BACH, 1994; KAY *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1997).

Muitos estudos têm demonstrado que o DM-1 pode ser induzido através da transferência de células recém isoladas de baço de camundongos NOD diabéticos para camundongos NOD jovens não diabéticos, camundongos NOD irradiados e camundongos NOD-SCID, os quais não desenvolvem diabetes (MILLER *et al.*, 1988; ROHANE *et al.*, 1995; WONG & JANEWAY 1997).

No conjunto, essas observações relacionadas a participação do linfócitos T tanto da insulite e, evolutivamente, do diabetes têm reforçado, direta ou indiretamente, a hipótese da etiologia autoimune. Contudo, apesar de experimentos

envolvendo o camundongo NOD fornecerem evidências do papel chave de substâncias mediadoras da destruição das células  $\beta$  produzidas por linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , existem evidências da presença de mecanismos efetores finais apoptóticos pelos quais essas células são destruídas.

### **1.3. Esteróides Sexuais e Doenças Autoimunes**

Dados fisiológicos, experimentais e clínicos demonstram a existências de diferenças nítidas na resposta imune entre os sexos. As fêmeas de várias espécies apresentam resposta imunológica mais vigorosa, timo mais desenvolvido, maiores concentrações de imunoglobulinas séricas, respostas primárias e secundárias mais intensas e maior resistência à indução de tolerância (CUTOLO *et al.*, 1995; OLSEN & KOVACS 1997). Várias doenças autoimunes têm maior prevalência nas mulheres, como tiroidite de Hashimoto, doença de Graves, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, miastenia grave e insuficiência adrenal idiopática (ANSAR *et al.*, 1985), sugerindo que as diferenças hormonais entre ambos os sexos podem conferir, nos homens efeitos protetores, ou aumentar a susceptibilidade nas mulheres (OLSEN & KOVACS, 1997).

No camundongo, síndromes autoimunes espontâneas são mais prevalentes em fêmeas do que em machos. Um bom exemplo é o camundongo NZB/WF1 modelo animal de lúpus eritematoso sistêmico. Esses camundongos desenvolvem geralmente uma desordem auto-imune, e as fêmeas geralmente morrem no primeiro ano de vida devido a glomerulonefrite, enquanto o padrão de mortalidade em machos é de 10% ou menos (OLSEN & KOVACS, 1997). No modelo NZB/WF1, as fêmeas desenvolvem rapidamente anticorpos anti-DNA e por 10-12 meses de idade a

mortalidade chega a 100%. Entretanto, a castração pré-puberal dos camundongos machos pode resultar na aceleração da doença com 100% de morte em 10-12 meses de idade. A administração de andrógenos em fêmeas ovariectomizadas suprime a atividade da doença prevenindo o aparecimento, porém a administração de estradiol em fêmeas castradas leva a progressão da doença comparada com fêmeas não castradas.

A importância dos esteróides sexuais influenciando a expressão de doenças autoimunes é observada na alteração dos níveis de esteróides gonadais, obtida na gonadectomia ou por manipulação farmacológica dos níveis de estrógeno e testosterona, e na alteração da resposta imune durante a gravidez (ROUBINIAN *et al.*, 1978).

A administração de testosterona em galinhas da raça obesa (OS chickens) *in ovo* ou após o nascimento também causa proteção significativa no desenvolvimento de tiroidite auto-imune nestes animais (SCHUURS *et al.*, 1992). Tais evidências sugerem que os andrógenos tenham papel supressor no desenvolvimento de doenças autoimunes.

#### **1.4. Esteróides Sexuais e Camundongos NOD**

O desenvolvimento do infiltrado linfo-plasmocitário nas ilhotas de Langerhans começa por volta da 4<sup>a</sup> semana de vida, estando presente em 100% das fêmeas e 90% dos machos após 30 semanas de vida (FUJITA *et al.*, 1982). Entretanto, existe nítido dimorfismo sexual na incidência do diabetes que acomete até 80% das fêmeas e no máximo 20% dos machos. As características da insulite também diferem entre os sexos, havendo número maior de ilhotas com lesões destrutivas entre as fêmeas



(LAMPTER *et al.*, 1989). O efeito da castração em camundongos machos e fêmeas com 30 semanas de idade mostra aumento na incidência dos diabetes 0% para 31% entre os machos e diminuição de 60% para 33% nas fêmeas. A timentomia, associado ou não a castração, modula a expressão do diabetes em ambos os sexos acelerando a instalação e aumentando a prevalência da doença nos camundongos fêmeas e nos machos observando discreto retardo na manifestação da doença. Além disso, a castração do macho modula a produção do hormônio no hipotálamo e hipófise por remoção com efeito de retroalimentação negativo da testosterona. Um hormônio hipotalâmico com propriedades imunomodulatórias cuja produção está aumentada pela castração é o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (MANSOOR *et al.*, 2003). Estudos com camundongos fêmeas NOD entre 4 e 6 semanas de idade que receberam implantes de 5- $\alpha$  diidrotestosterona (5DHT) não desenvolveram insulite ou diabetes (TOYODA *et al.*, 1996). Trabalhos prévios demonstraram a presença de receptor de andrógeno (AR) em células e tecidos do sistema imune, sendo o timo o órgão alvo da ação do andrógeno (TSAI & O' MALLEY, 1994; OLSEN & KOVACS, 2001) e estudos *in vitro* sugeriram a ação direta ou indireta dos andrógenos no desenvolvimento dos tímócitos (OLSEN & KOVACS, 2001). Por outro lado, receptores para andrógenos não têm sido detectado no baço (TAKEDA *et al.*, 1990; KUMAR *et al.*, 1995). Recentemente, foi mostrado efeitos estimulatórios dos andrógenos na proliferação e amadurecimento das células B (MEDINA & KINCADE, 1994).

### **1.5. *Imunoregulação, Citocinas e Destruição das Ilhotas Pancreáticas***

A resposta imune é coordenada por linfócitos T auxiliares (Th-THelper) cujas funções diferem de acordo com o estímulo antigênico e condições do microambiente no qual ocorre a resposta. Desta forma, os linfócitos Th são subdivididos nos fenótipos de resposta Th1, caracterizados pela expressão local de citocinas específicas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A resposta Th1 genericamente manifesta-se nas doenças autoimunes mediando a inflamação através da resposta imune celular, representada pelos linfócitos T citotóxicos, “natural killer” e macrófagos. Por outro lado, o fenótipo Th2 direciona resposta imune humoral com liberação local de citocinas do tipo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (revisto por RABINOVITCH, 1998). No contexto dos possíveis mecanismos envolvidos nas desordens autoimunes, o desequilíbrio entre as populações de células Th1 e Th2 com predominância do fenótipo Th1 parece ter substrato na fisiopatologia da quebra de tolerância e reações auto-imune que ocorrem na linhagem de camundongos NOD.

A hipótese na qual a destruição das células  $\beta$  ocorre quando há predomínio de citocinas do tipo Th1 sobre Th2 é proveniente de experimentos de imunidade passiva empregando-se linfócitos CD4<sup>+</sup> de camundongos NOD, tratados pela administração de superantígenos incorporados a adjuvante completo de Freund (CFA). A transferência destes linfócitos para animais NOD com 4 semanas de vida evitou a ocorrência do diabetes, em virtude de provável desvio da resposta imune de Th1 para Th2, devido a ação do superantígeno, com liberação de citocinas anti-

inflamatórias (IL-4, IL-10) (KAWAMURA *et al.*, 1993; QIN *et al.*, 1993). Postulou-se, então que os mecanismos deste tipo de proteção envolveriam ação seletiva sobre certas sub-populações linfocitárias T CD4+, desviando a resposta imune de padrão Th1 para Th2 com ampliação da resposta humoral, modulando a resposta celular no sentido de retorno a homeostasia imune.

O padrão de resposta observado em pacientes com DM-1 bem como camundongos NOD e ratos BB são marcados pelo predomínio de citocinas características da resposta Th1 (RABINOVITCH, 1998; HARTEMANN *et al.*, 1999; VENTURA OLIVEIRA *et al.*, 2002). Acredita-se ainda, que haja o envolvimento direto das células linfocitárias designadas células efectoras sobre as células  $\beta$  pancreáticas designadas células alvos, resultando na liberação de mediadores solúveis responsáveis pelo processo inflamatório local contribuindo para a destruição das ilhotas (CAMPBELL *et al.* 1988; PUKEL *et al.* 1988; BRADLEY *et al.*, 1999; GURLO *et al.*, 1999).

No campo experimental, diversos autores têm estudado os efeitos *in vitro* de citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  utilizando ilhotas isoladas de modelos animais. Nas ilhotas pancreáticas recém isoladas, os efeitos dessas citocinas têm sido amplamente estudados (RABINOVITCH *et al.*, 1994 e 1998; RABINOVITCH & SUAREZ-PINZON, 1998) mostrando que são capazes de, isoladamente, inibir a liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas e, combinadas, de induzir a fragmentação do DNA e destruição das células  $\beta$  pancreáticas (IWAHASHI *et al.*, 1996; RABINOVITCH *et al.*, 1994 e 1998, RABINOVITCH & SUAREZ-PINZON, 1988). Contudo, é possível que estudos *in vitro* não representem a magnitude da fisiopatologia da lesão pancreática que ocorre *in vivo*. A simples presença da citocina

na lesão da insulite não identifica seu papel na patogênese do DM-1, uma vez que esta pode ter função pro-inflamatória, ou mesmo antiinflamatória regulando, desta maneira, o processo inflamatório (RABINOVITCH & SUAREZ-PINZON, 1998).

No camundongo NOD, a expressão de IFN- $\gamma$  nas células infiltradas das ilhotas foi relacionada com a insulite destrutiva (TOYODA *et al.*, 1994; RABINOVITCH *et al.*, 1994; MUIR *et al.*, 1995). Essa citocina, assim como TNF- $\beta$ , tem suas expressões aumentadas de forma consistente com o envelhecimento dos camundongos NOD sugerindo que a destruição da ilhota e a manifestação do DM-1 associam-se com o aumento da produção pelas células do infiltrado inflamatório (HIRAI *et al.*, 2000). Reforçando ainda a importância da realização de estudos *in vivo*, pode-se observar em experimentos de expressão transgênica de IFN- $\gamma$  em células  $\beta$  de camundongos normais o papel citotóxico do IFN- $\gamma$  nas células  $\beta$ , e esses dados demonstraram a ocorrência da insulite mediada por células imunes, destruição das ilhotas pancreáticas e manifestação do DM-1 (SARVETNICK *et al.*, 1990).

Como referido anteriormente, a variedade de mecanismos tem sido proposta para explicar os efeitos citotóxicos das citocinas nas ilhotas pancreáticas, os quais incluem a formação de óxido nítrico que é mediador citotóxico da ação dessas citocinas por induzir a lise das células das ilhotas precedendo a lesão do DNA e ocasionando a sua destruição (RABINOVITCH *et al.*, 1994 e 1998, RABINOVITCH & SUAREZ-PINZON, 1998; GURLO *et al.*, 1999; THOMAS *et al.*, 2002). Sendo assim, pode-se sugerir que a destruição das células  $\beta$  ocorre por apoptose onde a fragmentação de DNA típica tem sido observada em ilhotas pancreáticas tratadas

com a combinação de IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (RABINOVITCH *et al.*, 1994; YAMADA *et al.*, 1996; SUAREZ-PINZON *et al.*, 1999; THOMAS *et al.*, 1999).

Baseando-se em experimentos que envolvem o camundongo NOD, outros mediadores também são capazes de efetuar a destruição das células  $\beta$ . Dentre os mediadores envolvidos nessa destruição incluem-se: conteúdos granulares das células T CD8<sup>+</sup>, como perforinas e granzimas, moléculas de superfície como Fas, Fas-L, TNF-R e outros membros da família TNF, reconhecidos por induzir a fragmentação do DNA e mudanças morfológicas características da apoptose através de sinalização de receptores que envolvem a ativação de proteases ou caspases (INGELSSON *et al.*, 1998; THOMAS & KAY, 2000).

Desta forma, de acordo com os dados experimentais expostos por esses autores, fica demonstrado que o controle da resposta imune é múltiplo e, provavelmente, depende da somatória de efeitos de várias citocinas que constituem um microambiente propício para a destruição das ilhotas pancreáticas.

### ***1.6. Janus-quinase (JAKs) - Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição (STATs) para citocinas.***

Um importante avanço para o entendimento dos possíveis mecanismos da regulação de células pelas citocinas tem sido a identificação e caracterização das vias de sinalização como a via JAK-STAT (DARNELL *et al.*, 1994; TANIGUCHI *et al.*, 1995; IHLE, 1996). Esta via representa sistema de sinalização rápida membrana-núcleo e esclarece parcialmente a base para a especificidade dos sinais que são induzidos pelas diferentes citocinas.

Citocinas e fatores de crescimento ligam-se a receptores na superfície celular ativando vias de sinalização de transdução, as Janus quinases (JAKs) e ativadores de transcrição STATs, promovendo respostas variadas incluindo alterações na função celular, crescimento e diferenciação. Tais efeitos são mediados através da modulação da expressão dos genes alvo (LEONARD *et al.*, 1997)

Nos mamíferos foram identificados 4 tipos de Jaks ; Jak1, Jak2, Jak3 e Tyk2. A expressão destas proteínas está aumentada nas células NK e timócitos, com exceção da expressão da Jak3 que está limitado em algumas células, tais como: células hematopoiéticas, músculo liso vascular e endotélio (IHLE, 1996). As Jaks possuem dois domínios denominados pseudoquinase e quinase. Diversos segmentos homólogos foram reconhecidos entre as Jaks (JH) recebendo nomenclatura análoga aos domínios Src (SH) da família PTKs. Sete regiões JH (JH1-JH7) foram descritos, com exceção da região JH 1 ou domínio catalítico, as demais regiões são pouco conhecidas.

Sabe-se que a sinalização do IFN  $\alpha/\beta$  requer Jak 1 e Tyk 2, assim como IFN  $\gamma$  requer Jak 1, Jak 2 (DARNELL *et al.*, 1994; WATLING *et al.*, 1993; MULLER *et al.*, 1993) e os hormônios de crescimento e eritropoietina ativam Jak2 ( ARGETSINGER *et al.*, 1993; WITTHULN *et al.*, 1993), a IL-6 ativa Jak 1, Jak 2 e Tyk 2 ( STAHL *et al.*, 1994) e Jak 3 é ativado por citocinas cujo receptores contêm  $\gamma c$  (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15).

As Stats são proteínas citoplasmáticas que formam dímeros intermoleculares após a fosforilação da tirosina com subsequente translocação ao núcleo onde ativam genes alvos (DARNELL *et al.*, 1994). Nos mamíferos as 7 proteínas Stats conhecidas

são: Stat 1, Stat 2, Stat 3, Stat 4, Stat 5a, Stat 5b e Stat 6 (FU *et al.*, 1992; ZHONG *et al.*, 1994; HON *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1996).

Hoje sabemos que Jaks e Stats medeiam respostas de ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento. A transdução de sinal usada pela IL-12 via Jak-Stat é a melhor caracterizada. O tratamento de linfócitos T humanos com IL-12 induz a rápida fosforilação da tirosina de dois membros da família Jak tirosina quinase, Jak2 e Tyk2, implicando estas quinases na imediata resposta bioquímica a IL-12 (BACON *et al.*, 1995a; ZOU *et al.*, 1997). Além disso, evidências têm mostrado que IL-12 induz a fosforilação de Stat4 em linfócitos ativados (BACON *et al.*, 1995b; CHO *et al.*, 1996). Assim, o entendimento de sua produção e sinalização reveste-se de interesse para entendermos os mecanismos envolvidos na resposta imune presente nas várias patologias.

## **2. OBJETIVOS**

---



O presente trabalho tem por objetivos avaliar:

1. O efeito de diferentes concentrações e intervalos de administração de testosterona sobre a incidência do diabetes tipo 1 auto-imune e a intensidade do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas (insulite) em camundongos fêmeas da linhagem NOD.

2. Os efeitos do tratamento *in vivo* e *in vitro* de testosterona sobre a expressão gênica das citocinas IL-12, IFN-gama e TNF-alfa (*in vivo*) e IL-10, IL-12, IFN-gama e TNF-alfa (*in vitro*) em células esplênicas e pâncreas de animais tratados com testosterona.

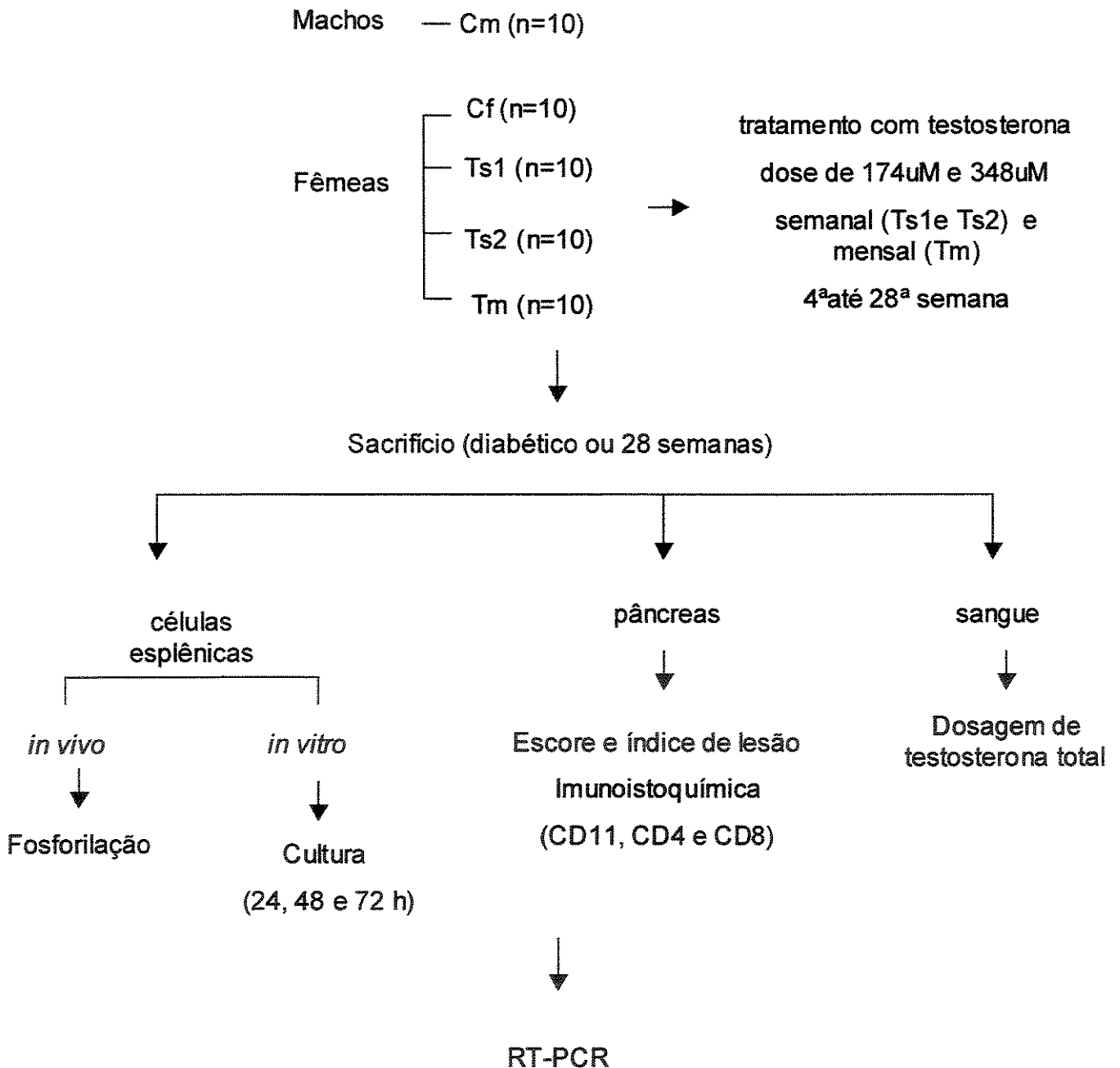
3. Os efeitos da administração de testosterona sobre a ativação da via Jak-Stat

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

# Fluxograma dos Procedimentos Metodológicos

## Grupos Experimentais



### 3.1. Animais

Os camundongos utilizados neste estudo eram obtidos da colônia NOD proveniente do INSERM U-25, Hospital Necker (Paris, França), implantada e mantida pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) desde 1994, em condições livres de patógenos. A frequência cumulativa do DM-1 clínico espontâneo registrado na colônia de camundongos da NOD-Uni 25 semanas de idade, tem se mantido ao redor de 85% entre as fêmeas e de 5 a 20% entre os machos, revelando-se similar à da colônia de origem (PAVIN & ZOLLNER, 1994).

### 3.2. Grupos Experimentais e Tratamentos

40 animais fêmeas e 10 machos objetos de estudo provenientes do Cemib/Unicamp eram mantidos em condições livres de patógenos conhecidos com controle de luz, temperatura e umidade no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental, recebendo água e ração padrão autoclavadas e oferecidas *ad libitum*.

Os grupos experimentais eram estabelecidos como a seguir e representado na tabela 1:

Grupos	Número	Dose ( $\mu$ M)	Intervalo de administração
Cm	10	Sem tratamento	
Cf	10	Solução salina	semanal
Ts1	10	174	semanal
Ts2	10	348	semanal
Tm	10	174	mensal

**Tabela 1.** Grupos experimentais empregados e as respectivas doses utilizadas e a frequência da administração

### **Protocolo1:**

**Tratamento semanal e mensal com Propionato de Testosterona: Estudo da expressão gênica de citocinas e do diabetes**

20 animais fêmeas eram sub-divididos igualmente em dois grupos: Ts1 (174uM) e Ts2 (348uM).

**Grupo Ts1 (174 $\mu$ M):** camundongos fêmeas da linhagem NOD tratadas semanalmente com propionato de testosterona (Durateston®, Organon, Brasil) na dose de 3,5 mg/kg por via intramuscular a partir da 4ª semana de vida durante 28 semanas.

**Grupo Ts2 (348 $\mu$ M):** camundongos fêmeas da linhagem NOD tratadas semanalmente com propionato de testosterona (Durateston®, Organon, Brasil) na dose de 7,0 mg/kg por via intramuscular a partir 4ª semana de vida durante 28 semanas.

**Grupo Tm (174 $\mu$ M):** camundongos fêmeas da linhagem NOD tratadas mensalmente com propionato de testosterona (Durateston®, Organon, Brasil) na dose de 3,5 mg/kg por via intramuscular a partir da 4ª semana de vida durante 28 semanas.

A dose de propionato de testosterona (Durateston®) administrada até a 28ª semana era ajustada semanalmente a partir dos pesos dos animais.

### **Animais do grupo Controle**

10 camundongos machos e 10 fêmeas eram definidos como grupos controles: Cm e Cf respectivamente.

**Grupo Cm:** camundongos da linhagem NOD machos sem tratamento e mantidos até o final do protocolo (28 semanas).

**Grupo Cf:** camundongos da linhagem NOD fêmeas de 4 semanas de vida recebendo tratamento semanalmente com solução salina estéril por via intramuscular até 28ª semana de vida.

Ao final das 28 semanas de protocolo experimental, os animais eram sacrificados, ou quando apresentassem glicemia acima de 250 mg/dl (13,8 mM) em duas dosagens consecutivas (ITOH *et al.*, 1997; JUN *et al.*, 1999; VENTURA *et al.*, 2002).

### **Protocolo 2:**

#### **Avaliação da via de sinalização JAK-STAT**

12 camundongos fêmeas da linhagem NOD, eram mantidas nas mesmas condições sanitárias relatadas anteriormente sem nenhum tratamento até a idade de 8 semanas. Esses animais eram, então, sacrificados para o estudo dos efeitos da testosterona sob a via de sinalização Jak-Stat.

### **3.3. Diagnóstico do Diabetes e Sacrifício dos animais**

A ocorrência do diabetes mellitus era monitorada em todos os animais a partir da sua retirada do CEMIB. As glicemias eram monitoradas semanalmente em jejum através de glicosímetro Prestige LX® (Home Diagnostic, EUA) retirando-se amostra

de sangue da veia caudal do animal. Os animais eram considerados diabéticos após leituras por dois dias consecutivos e confirmação da glicemia através de glicosímetro com valores de glicemia superiores a 250 mg/dl (13,8 mM) estabelecido no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (VENTURA-OLIVEIRA , 2002)e em concordância com ITOH *et al*, (1997) .

Os animais que apresentaram diabetes, isto é, com valores de glicemia sanguínea maiores que 250 mg/dL e antes de completarem o tempo de 28 semanas, eram anestesiados com tiopental sódico 2,5% (Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda) (15 a 30mg/kg de peso corpóreo) e o sangue periférico coletado através de punção cardíaca e transferido para tubo plástico de 1,5 ml para centrifugação e posterior separação de soro no qual se realizava dosagem de testosterona. Após este procedimento, realizava-se a remoção do pâncreas juntamente com a retirada do baço, o qual era acondicionado em tubo de vidro estéril contendo solução tampão de Hanks (Sigma, USA).

O pâncreas era depositado em cápsulas contendo meio de inclusão O.C.T (Tissue Tek® Miles – EUA) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. A seguir eram conservados em bio-freezer a - 80°C até processamento histológico. Após este procedimento os pâncreas eram submetidos a criocortes para estudo morfológico, imunoistoquímica. O restante de tecido pancreático era conservado em guanidina-sarcosyl para futura extração de RNAT.

### **3.4. Dosagem de testosterona**

As concentrações de testosterona total foram dosadas através do método de eletroquimioluminescência Eclesys Testosterone reagent kit (ECLIA – Roche Diagnostics Corporation, EUA). A sensibilidade analítica do kit era de 0,069 nM/L (0,02 ng/ml).

### **3.5. Análise Morfológica**

A avaliação histológica dos pâncreas objetivou a análise da morfologia das ilhotas e caracterização do grau de insulite, sendo realizada nos pâncreas de todos os grupos, tratados e controles.

Os pâncreas eram transferidos e posicionados no suporte do criostato de maneira a se obter a maior área possível de corte. Os cortes eram coletados em série de seis cortes consecutivos de 5µm de espessura e depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas ( $\gamma$ -Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane - Sigma St Louis, EUA). Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas era desbastado 300µm e, a seguir, outra série de nove cortes era igualmente processada. Repetia-se este procedimento outras quatro vezes obtendo-se os conjuntos de lâminas representados no esquema 1.

As lâminas nº: 1, 7, 13 e 19 - obtidas através de criocortes eram corados pela técnica da hematoxilina e eosina, observadas em microscópio óptico (Axioscope, Zeiss, Darmstad-Alemanha), permitindo detectar a presença de infiltrado inflamatório em toda extensão do órgão. Os cortes nos quais se evidenciava a presença de infiltrado inflamatório eram classificados segundo o grau de insulite apresentado e o



número total de ilhotas Langerhans contados. As lâminas subsequentes eram utilizadas para a caracterização linfocitária para CD4+, CD8+ e CD11+.

A classificação utilizada nas ilhotas pancreáticas, segundo o grau de insulite apresentado, era realizada seguindo adaptações e atribuindo-lhes pelos critérios propostos por SIGNORE *et al.* (1989) e PAPACCIO, BACCARI & MEZZOGIORNO (1993).

**0** = ilhota normal, na ausência de infiltrado.

**1** = peri-insulite, presença < 25% de infiltrado ao redor e no interior da ilhota.

**2** = insulite moderada, 25 - 80% da ilhota invadida pelo infiltrado.

**3** = insulite invasiva, > 80% da ilhota invadida pelo infiltrado. Ocupação extensiva da ilhota.

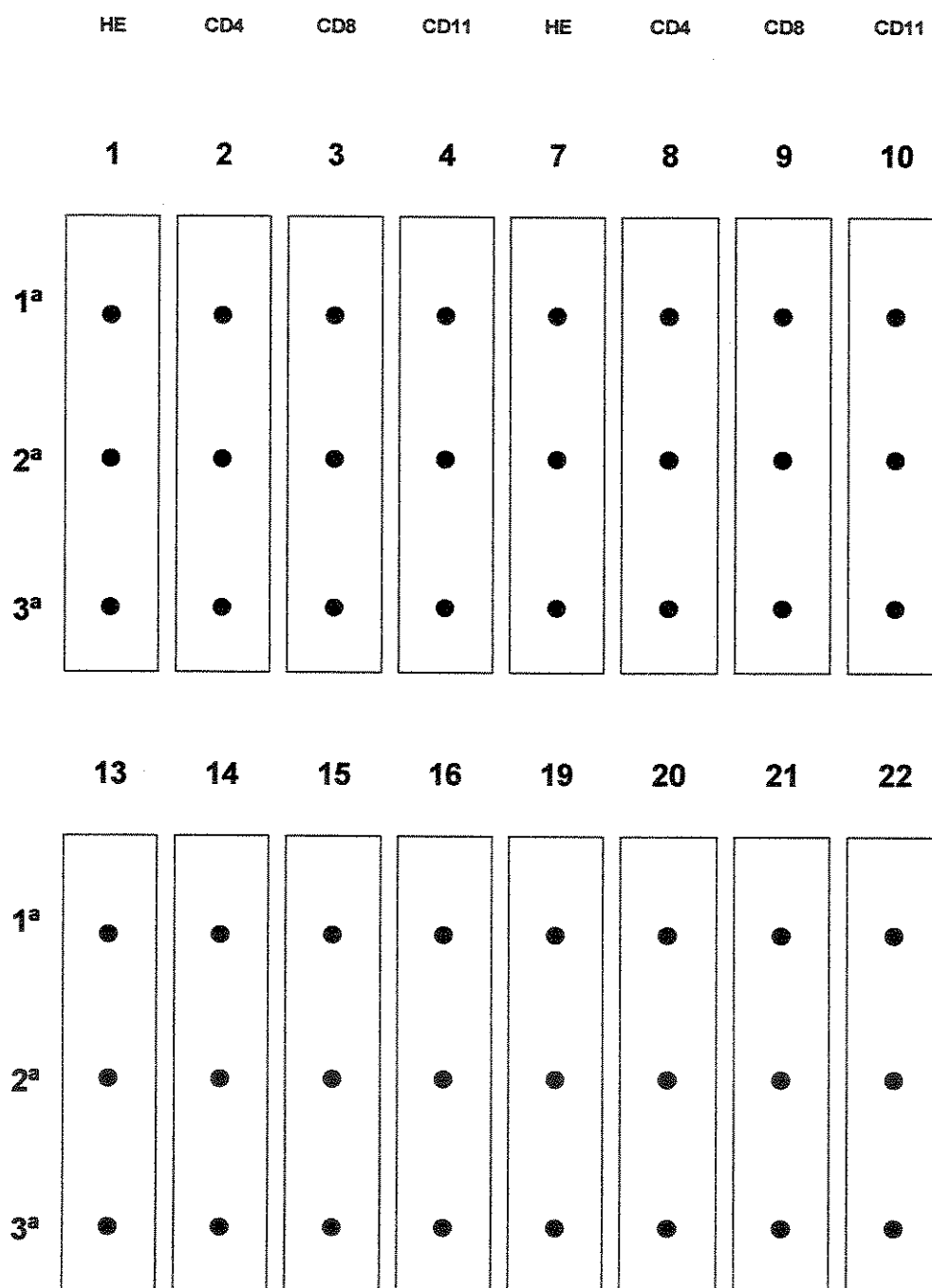
**4** = insulite destrutiva, invasão total da ilhota pelo infiltrado.

As ilhotas eram contadas e classificadas por grau, em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados eram representados pela média e desvio padrão referente relação número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, para cada grupo experimental, e calculava-se o Índice, segundo a fórmula: (LEITER, 1997).

$$I = \frac{(0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4)}{4 \times (N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4)}$$

Índice = 1 destruição total da ilhota

0, 1, 2, 3 e 4 representam os diferentes graus de insulite (como descrito anteriormente) e N<sub>0</sub>, N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub> e N<sub>4</sub> o número total de ilhotas com seus respectivos graus de infiltração.



**Esquema 1-** Representação do procedimento para a obtenção dos conjuntos de cortes analisados para estudo morfológico e quantitativo das ilhotas pancreáticas.

### **3.6. Imunoistoquímica**

Para a especificação do infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas realizava-se a fenotipificação do infiltrado para linfócitos T expressando marcadores CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD11<sup>+</sup> provenientes de cortes histológicos congelados.

A técnica empregada era de imunofluorescência indireta. O anticorpo secundário foi acoplado à biotina, permitindo a fixação de várias moléculas de estreptoavidina-FITC, a fim de se amplificar o sinal. As lâminas após prévia fixação em acetona durante 15 minutos eram lavadas uma vez em PBS (solução de salina fosfatada tamponada) e em seguida os cortes eram incubados em 2,5% BSA V (albumina bovina fração V; GibcoBRL, EUA); 2%; leite desnatado em pó e 8% SFB (HyClone – Utah, EUA) durante 45 min, para bloqueio de sítios inespecíficos. Aproximadamente 50µl do anticorpo primário anti CD4 (L3T4 produzido em rato), CD8 (produzido em rato) e CD11(produzido em rato) (BD PHARMINGEN, Califórnia, EUA) eram adicionados a cada corte (diluição 1:35) e incubados por toda noite, a 8°C, em câmara úmida, protegida contra luminosidade. Em seguida, as lâminas eram lavadas seis vezes, durante 5 minutos, em tampão PBS. As lâminas eram então, tratadas novamente com solução bloqueio durante 45 min. Em seguida 50µl do anticorpo secundário (10 µg/mL) biotinilado com FITC anti- rato IgG para CD4, CD8 e CD11 ( Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA) era adicionado e incubado por duas horas nas mesmas condições descritas anteriormente. As lâminas eram lavadas em PBS seis vezes e montadas em glicerol. Os cortes de pâncreas, assim preparados, eram observados e fotografados em fotomicroscópio (Olympus – modelo 1X50 – Japão).

### **3.7. Isolamento de Células Mononucleares do Baço:**

Sob anestesia de tiopental sódico 2,5% os animais tiveram seus baços removidos assepticamente e colocados em placa de Petri estéril, contendo solução salina de Hank (Sigma Co, St Louis, EUA). Posteriormente, os baços foram cuidadosamente macerados, utilizando-se peneiras estéreis (Sigma). A seguir, as células foram lavadas em solução salina de Hank (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos, a 1500 rpm, processo este repetido por três vezes. Após a primeira centrifugação, o botão celular foi tratado com tampão de lise com o objetivo de eliminar eritrócitos e foram realizadas mais duas lavagens com solução de Hank e ao pellet obtido foi adicionado solução de guanidina-sarcosyl e armazenado a - 80°C para posterior extração de RNA. Para ensaio *in vitro* a suspensão celular foi diluída em meio RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino a 5% (Hyclone), 2-mercaptoetanol (1:5000), glutamina 0.2M (1%) (Hyclone) e 4,25 mg/ml de gentamicina. Foi efetuada a contagem em câmara de Neubauer pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan e, a concentração de células foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células/ml. As células do baço assim obtidas foram destinadas para estudo de proliferação celular, cultura de células para análise de citocinas e extração de RNA total.

### **3.8. Análise da Linfoproliferação Através de Ensaio com MTT**

As células do baço obtidas segundo protocolo acima, foram colocadas em placas para cultura com 96 poços (Falcon, New Jersey, EUA), cultivadas em meio RPMI 1640, enriquecido com soro fetal bovino 5% (Hyclone), 2-mercaptoetanol (1:5000), estreptomicina 8,5mg/ml, penicilina 10mg/ml, fungizol 2µg/ml, Hepes

(20mM). As amostras foram realizadas em triplicata, para avaliação da transformação blástica, as células mononucleares foram mantidas em cultura com Fenil propionato de testosterona nas concentrações de 5,10,20 e 30nM e apenas com meio de cultura (sem estímulo) durante 72 horas, em incubadora contendo tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após este período cada poço recebeu 10µl de MTT (5mg/ml em PBS), incubando-se por 4 horas (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Adicionou-se 100µl de SDS (10%) diluído em HCl 0,01N, incubando-se por 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectramax, com comprimento de onda de 560nm e 690nm como referência de fundo.

### ***3.9.Cultura de Células Mononucleares do Baço e Estímulos***

Foram realizadas culturas de 24, 48 e 72 horas de células mononucleares de baço, submetidas a diferentes concentrações de testosterona. As culturas foram realizadas em triplicata e estimuladas com as concentrações de 5nM, 10nM, 20nM e 30 nM de Fenil Propionato de Testosterona, sem estímulo e com Concanavalina A (ConA, Sigma) na concentração de 2,5µg/ml. Após o término do período o conteúdo dos poços foi retirado e centrifugado, sendo o "pellet" destinado à biologia molecular.

### ***3.10. Extração de RNA Total (RNAT)***

As amostras de RNA total eram extraídas das células esplênicas e pancreas, através do método de Guanidina Tiocianato - Fenol - Clorofórmio (CHOMCZNSKI & SACCHI, 1987) adaptado Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) conforme descrição a seguir.

As células esplênicas e pancreas eram respectivamente agrupadas e homogeneizadas em solução de extração de RNA, 4M guanidina tiocianato contendo

2-mercaptoetanol (Sigma) e 0,5% sarcosil pH 7,0. O volume do tampão de extração guanidina (GBL) dependia do número de células ou tamanho do tecido.

Para a separação das proteínas dos ácidos nucleicos adicionava-se volume igual de solução Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1). A seguir, esta mistura era agitada vigorosamente formando emulsão e centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente, a 10.000 x g, recuperando-se a fase aquosa (superior). Repetia-se a extração com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico até que não houvesse proteínas na interfase.

A retirada do excesso de fenol era realizada pela extração com Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1). O RNA na fase aquosa era precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto e acetato de sódio pH 5,2, na concentração final de 0,3M. Esta preparação era mantida à - 80°C por 48 horas. Para a precipitação do RNAT a preparação era centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. Ao precipitado celular, era adicionada 40µl de água ultrapura estéril preparada com Dietil Pirocarbamato (DEPC, Sigma) e armazenando à - 80°C.

### **3.11. Análise do RNA Total Extraído**

A qualidade do RNA total extraído era analisada através da relação entre suas leituras em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, EUA) nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Eram consideradas adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8. A quantificação do RNA total era feita através da fórmula: (densidade óptica a 260nm/0,025) x diluição de leitura/1000= RNA µg/µl.

### **3.12. Transcrição Reversa do RNA total Extraído (cDNA)**

A síntese do cDNA era realizada a partir de 5µg de RNA total. Para a realização PCR de transcrição reversa (RT-PCR), adicionava-se à amostra 0,5µl de Oligo d(pt) e água ultra pura em quantidade suficiente para 28µl. Aquecia-se os tubos com as respectivas amostras em termocicladora (GeneAmp® 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65°C e resfriava-se para 4°C por 5 minutos.

Para permitir a ligação complementar dos *primers* ao RNA, adicionava-se 21µl de solução de reação (10µl de tampão Super RT, 5µl de dNTP mix 0,5mM, 5µl de DTT 0,1M e 1µl de RNAsin) seguidos da incubação por 2 minutos a 42°C. Após adição de 1µl de enzima Super Transcriptase reversa (500U), a reação processava-se em termocicladora nas condições: 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos, resfriamento da amostra até 4°C adaptado pelo Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental (BOECHAT *et al.*, 2002).

Após a ultima etapa as amostras, com volume de 50µl, eram armazenadas a -20°C como DNA complementar (cDNA).

### **3.13. Amplificação de cDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)**

O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação, 2µl de amostra de cDNA, 100ng de primer 5' sense, 100ng de primer 3' anti-sense, 45µl de solução de reação (5µl de tampão Taq polimerase - *Thermus aquaticus* DNA polimerase gene (GibcoBRL, EUA); 5µl de dNTP mix 5nM, 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM e 33,5µl de água ultra pura) e 1µl de óleo mineral. Em seguida os tubos contendo as misturas de cDNA eram transferidas para termocicladora programada

para as seguintes condições: Desnaturação a 94°C por 2 minutos, 80°C por 5 minutos para aplicação de 1µl da enzima Taq polimerase, Pareamento 58°C por 45 segundos, extensão dos *primers* a 72°C por 90 segundos, desnaturação dos *primers* a 95°C por 45 segundos, 40 ciclos, extensão final 72°C por 10 minutos, temperatura de espera 4°C. Os produtos dos PCR eram armazenados a -20°C.

Primer	Sense	Anti-sense	Produto
TNF- $\alpha$	5' CTTAGACTTTGCGGAGTCCG 3'	5' CCCTGTCACTGGACCTGACA 3'	254pb
IFN- $\gamma$	5'AAGTGGCATAGATGTGGAAG 3'	5'CTGGACCTGTGGGTGTTGA 3'	265pb
IL-10	5'AGCTGGACAACATACTGCTAACC 3'	5'TCATTTCATGGCCTTGTAGACAC3'	366pb
IL-12	5'AGCTTTTGTGACAACCAATAAGAAC 3'	5' CAAACTCACAGAGATCTGCCTG 3'	297pb
Ciclofilina	5' GACAGCAGAAAACCTTCGTGC 3'	5' GGTTCGACTCACCGACC T 3'	276pb

**Tabela 2:** Os *primers* utilizados com suas seqüências descritas abaixo obedeciam à estratégia sense e anti-sense: TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ; IL-10; IL-12 e ciclofilina (gene estrutural). pb= pares de bases

### **3.14. Análise dos Produtos da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por Eletroforese em Gel de Agarose**

As amplificações dos cDNA através de primers específicos para citocinas eram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, e revelados com brometo de etídio, através de excitação em UV e documentadas fotograficamente em sistema de documentação fotográfica (NucleoVision, Nucleo Tech, CA, EUA). A



intensidade das bandas era analisada por captação da imagem dos géis e submetidos à análise com *software* GelExpert (NucleoTech). Todas as amostras eram submetidas a dois novos procedimentos de PCR, objetivando excluir falsos negativos resultantes de erros de procedimento.

#### Preparo de 50ml de gel de Agarose 1,5%:

Agarose 1,5% era preparada em tampão TBE (Ácido Bórico/Tris/EDTA/H<sub>2</sub>O ultrapura) e adicionada de 2µl de brometo de etídio.

#### Preparo das amostras:

As amostras eram preparadas misturando 8µl de cDNA e Tampão GBX (tampão de amostra de PCR) e 5,5µl de água ultrapura. Utilizava-se como tampão de corrida eletroforética Tampão TBE adicionado de 2µl de brometo de etídio. O padrão de DNA (DNA marker φX174 RF Hae III Fragments (Gibco) era aplicado em todas as eletroforeses. As condições de eletroforese eram: 45 minutos a 70 volts, 150mA..

### **3.14. Análise Semiquantitativa do RNA mensageiro**

A semi-quantificação do mRNA era obtida pela relação entre as áreas de pixel determinadas para as bandas correspondentes ao RNA mensageiro em questão e aquelas observadas para a ciclofilina (gene estrutural). Os valores foram normalizados e transformados em Unidades arbitrárias (pixel index) através da seguinte fórmula:

Expressão semiquantitativa (Unidades arbitrárias) = (área de pixel do RNA mensageiro a ser avaliado/ área de pixel da ciclofilina) x 100.

### **3.15. Preparo do Extrato de baço (avaliação da via Jak – STAT)**

Anestesiava-se o animal com solução de tiopental sódico 2,5% Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA) (15 a 30mg/kg por peso), abria-se a cavidade abdominal para exposição da veia cava inferior e aplicavam-se 50µL de insulina (3,3nM), 50µl de propionato de Testosterona (Durateston®, Organon, Brasil) nas concentrações de 5nM, 10nM, 20nM, 30nM e 1µM em cada animal. Primeiramente foi realizado um ensaio para estipular o melhor tempo de ativação para cada tirosina quinase analisada. Assim, utilizou-se os tempos de 0, 90 segundos, 3, 10 e 15 minutos. Após os testes preliminares verificamos que as concentrações de testosterona que fosforilavam as tirosinas quinases eram 5nM, 20 nM e 1µM e os tempos foram 90 segundos para Tyk2 e 15 minutos para Jak2, Stat3 e Stat4. Como controle de ativação utilizamos a insulina no tempo de 3 min (Saad *et al.*, 1995) e solução fisiológica 0,9% com tempo 0 (zero). Passado os tempos estipulados, os baços eram coletados e acondicionados em tubos de 1,5 ml contendo 800 µL de solução Tampão de extração para imunoprecipitado gelado (EDTA 10 mM, Tris 100mM, Pirofosfato de Na 10 mM, Fluoreto de Na 100mM, Ortovanadato de Na 10nM, Phenyl metilsulfonil fluoride 2mM (PMSF) , Aprotinina 0,1 mg/ml (Trasylol® - Bayer), H<sub>2</sub>O deionizada e processado com o auxílio do homogeneizador de tecidos (Polytron). A esse processado adicionava-se solução de Triton 10% (10% do volume obtido), seguido de homogeneização e centrifugação a 12000 rpm / 4°C / 20 min. No sobrenadante realizava-se dosagem protéica através do Método de Biureto (Reativo de Biureto

Protal: EDTA/ Cu 13 mM/ L; NaOH 875 mM/L) com diluição das amostras (1:20) e leitura em 540 nm em espectrofotômetro (U-2001 Spectrophotometer HITACHI, Japão).

### **3.16. Imunoprecipitação e Immunoblotting**

A concentração dos sobrenadantes foi ajustado para 1mg de proteína e imunoprecipitados com anticorpos (diluição 1:10) de anti-JAK2 (rabbit polyclonal, sc-294), anti-Tyk2 (rabbit polyclonal, sc-169), STAT-3 (rabbit polyclonal, sc-482) e STAT-4 (rabbit polyclonal, sc-486) (Santa Cruz Technology, CA, EUA) durante 2 horas. O complexo de imunoprecipitado era coletado empregando-se proteína A-Sephadex (Amersham-Pharmacia Biotech, Suécia) e submetidos a 3 lavagens com solução de lavagem (Ortovanadato de Na 2 mM, Tris 100mM pH 7.4, EDTA 1mM, Triton 0,5% , H<sub>2</sub>O deionizada). Adicionava-se a estes, tampão Laemmli contendo 100mM/L de DTT (Dithiothreitol – Sigma) e aquecido em água fervente por 5 min. e submetidos a eletroforese em gel a 8% de poliacrilamida – SDS por 2 horas. Realizou-se a eletro-transferência de proteínas (immunoblotting) do gel para membrana de PVDF (BioRad, EUA) seguindo-se basicamente o método de TOWBIN *et al.* (1979) durante 2 horas. Após as transferências, as membranas de PVDF, eram bloqueadas com solução basal (Tris 10mM pH 7,4, NaCl 150mM, Tween 20), leite desnatado 0,2% durante 2 horas a temperatura ambiente, incubadas com 5µg/mL anticorpo  $\alpha$ -fosfotirosina (PY20 – sc-508, Santa Cruz Technology, CA, EUA), 20µg/mL IgG anti-mouse (Sigma) e 2 µCi/µg solução de proteína A-Iodo<sup>125</sup> (Amersham-Pharmacia Biotech, Suécia). A cada adição de anticorpo foram realizadas 3 lavagens com solução basal e o tempo para cada incubação era de 2 horas em temperatura ambiente. As membranas eram envolvidas em filme plástico após a secagem,

expostas ao filme de raio-X e armazenadas em cassete a - 80°C durante 21 dias. A detecção das bandas era visualizada após revelação do filme, documentada fotograficamente em sistema de documentação fotográfica NucleoVision (NucleoTech) e submetidos à análise com *software* GelExpert (NucleoTech).

### **3.17. Análise estatística**

Os resultados eram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados relativos às citocinas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) entre grupos seguido pelo teste *Tukey* para análise de contrastes. Os resultados provenientes da ativação Stat-Jak eram submetidos a ANOVA seguido pelo teste Kruskal-Wallis com post-test. Valores com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **4. RESULTADOS**

---

#### ***4.1. Influência da concentração e frequência do tratamento com propionato de testosterona no nível plasmático***

Os soros dos animais tratados com diferentes concentrações e frequência de administração (semanal e mensalmente) foram dosados para verificar as diferenças nos níveis plasmáticos de testosterona. Como mostra a tabela 3 altas concentrações de testosterona foram verificadas na dose de 348 $\mu$ M na administração mensal.

#### ***4.2. Efeito da administração da testosterona na manifestação do diabetes e destruição das ilhotas pancreáticas***

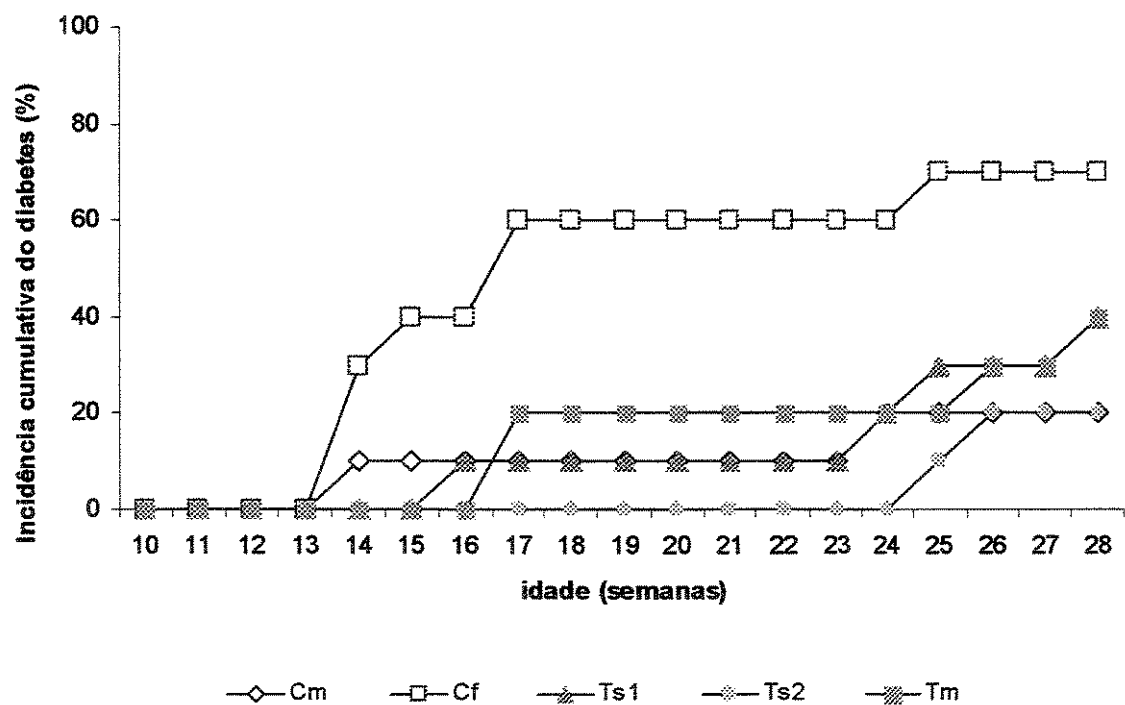
Os efeitos dos andrógenos no início do diabetes e os graus de lesão pancreática foram determinados pelo nível de glicemia e pelo índice de lesão insular. Os resultados obtidos mostram a diminuição da incidência do diabetes com efeito dose dependente da testosterona (Figura 1). Na dose de 348  $\mu$ M administrado semanalmente, observamos diminuição para 20% na incidência da doença, dado similar observado nos camundongos machos e na dose de 174 $\mu$ M de testosterona tanto semanalmente (Ts1) e mensalmente (Tm2) a redução da incidência foi de 40%.

Comparando o índice de insulite, os animais que receberam a dose de 348 $\mu$ M apresentam baixo índice de lesão pancreática em relação aos animais dos grupos controle (Cm e Cf) e aos animais tratados com a concentração de 174 $\mu$ M de testosterona ( Figuras 2 e 3).

Além disso, a manifestação da doença nos animais tratados ocorreu entre a 24<sup>a</sup> e 26<sup>a</sup> semana ,enquanto nos animais dos grupos controles Cf e Cm entre 14<sup>a</sup> e 19<sup>a</sup> semana.

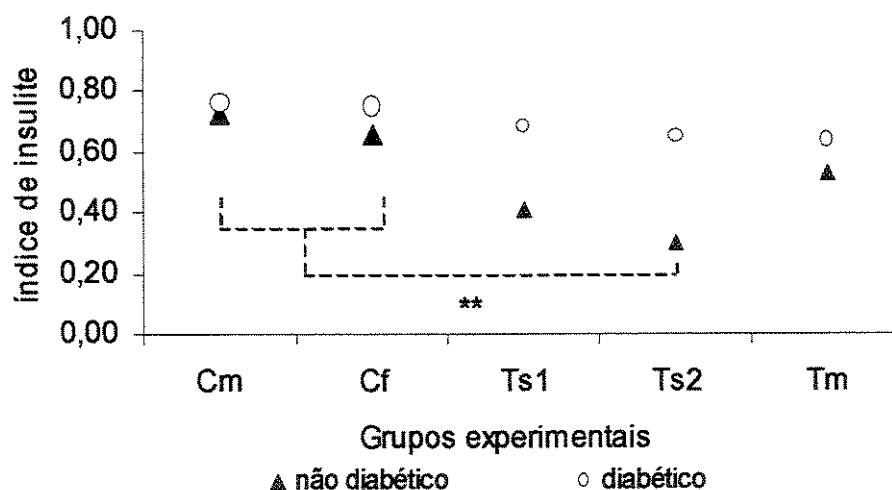
	Testosterona	Testosterona
Grupos	ng/ml	nM/L
Cm	4,56	15,8
Cf	0,3	1,04
Tm	0,5	1,73
Ts1	2,11	7,32
Ts2	6,5	22,5

**Tabela 3.** Dosagem de testosterona plasmática nos grupos experimentais. Os animais do grupo Ts2 apresentaram os níveis mais elevados deste hormônio.



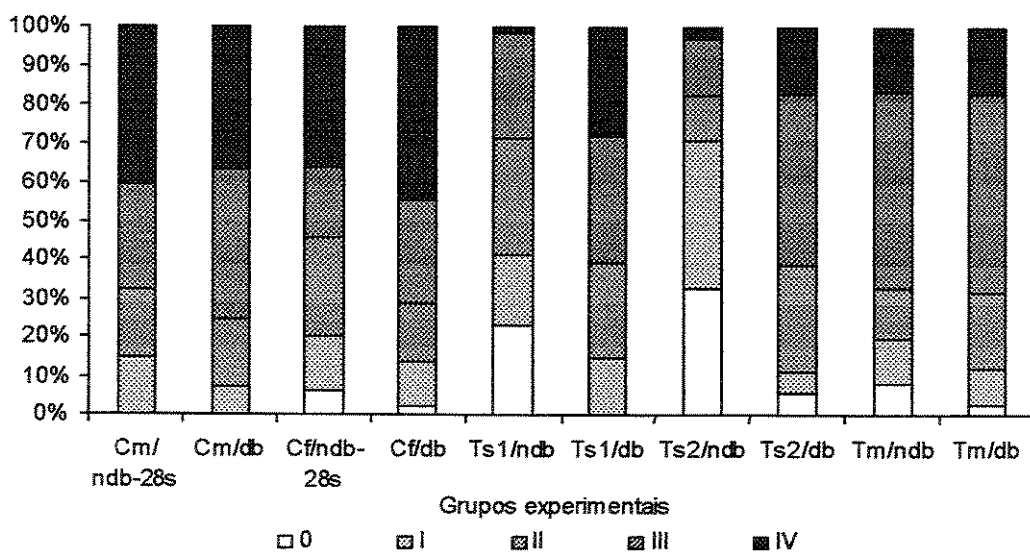
**Figura 1.** Níveis glicêmicos do camundongo NOD da 14<sup>a</sup> a 28<sup>a</sup> semana de vida submetidos ao tratamento com testosterona e seus respectivos controles. O diabetes foi definido pelo nível de glicose no sangue  $\geq 250$ mg/dl.





**Figura 2.** Índice de insulina em camundongos NOD tratados com testosterona e seus respectivos controles. O grupo controle é constituído por machos e fêmeas NOD tratados com salina. O maior índice foi observado nos animais diabéticos. O grupo Ts2 tratado semanalmente com 348 $\mu$ M de testosterona apresenta índices significativamente reduzidos quando comparado com os grupos controle (Cm e Cf).

\*\*p<0,01



**Figura 3.** Classificação de ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongos NOD tratados com testosterona e seus respectivos controles.

### **4.3. Imunoistoquímica**

A imunoistoquímica do infiltrado insular revelou a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e macrófagos, especialmente intensos em animais diabéticos. (Prancha I) e a análise qualitativa das subpopulações linfomononucleares confirmou o efeito imunomodulatório da testosterona no pâncreas

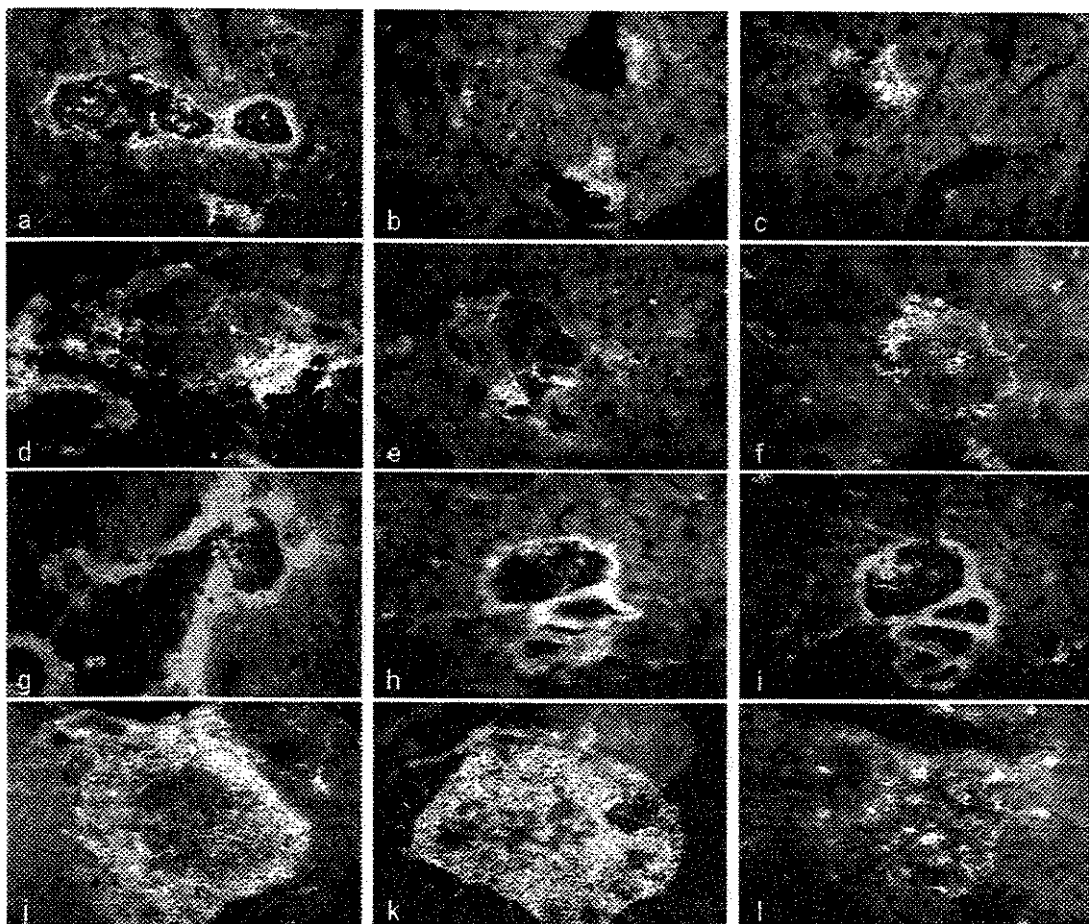
No grupo Cm observou-se predomínio da imunomarcção para CD11<sup>+</sup>, macrófagos (prancha I - figura a). Contudo, há um pequeno número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, principalmente em região perivascular (prancha I - figuras a e b). Em machos diabéticos (grupo Cm diabético) verificou-se aumento de macrófagos e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (prancha I -figuras d, e, f).

Em fêmeas não diabéticas (Cf não diabéticos), observou-se presença de infiltrado perivascular constituído por macrófagos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (prancha I, figuras g, h, i). No grupo controle de fêmeas com a manifestação do diabetes (Cf diabéticos) houve um aumento substancial de células CD11<sup>+</sup> (macrófagos) invadindo a ilhota de Langerhans, assim como células CD4<sup>+</sup> ocupando quase a totalidade da ilhota. O número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nestes animais apresentou-se dispersa por toda área da ilhota (prancha I - figuras j, k, l).

Nos animais do grupo Ts1, foram observados poucas células CD11<sup>+</sup>, linfócitos T CD4<sup>+</sup> em região perivascular (Prancha II - m , n) apresentando padrão semelhante aquele observado na marcação para células CD8<sup>+</sup> (Prancha II - figura o). Ao contrário, nos animais do grupo Ts2 há discreto infiltrado perivascular CD11<sup>+</sup> (macrófagos), linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Prancha II - figuras p, q, r). O grupo de animais que recebeu tratamento mensal com testosterona (Tm) apresentou infiltrado

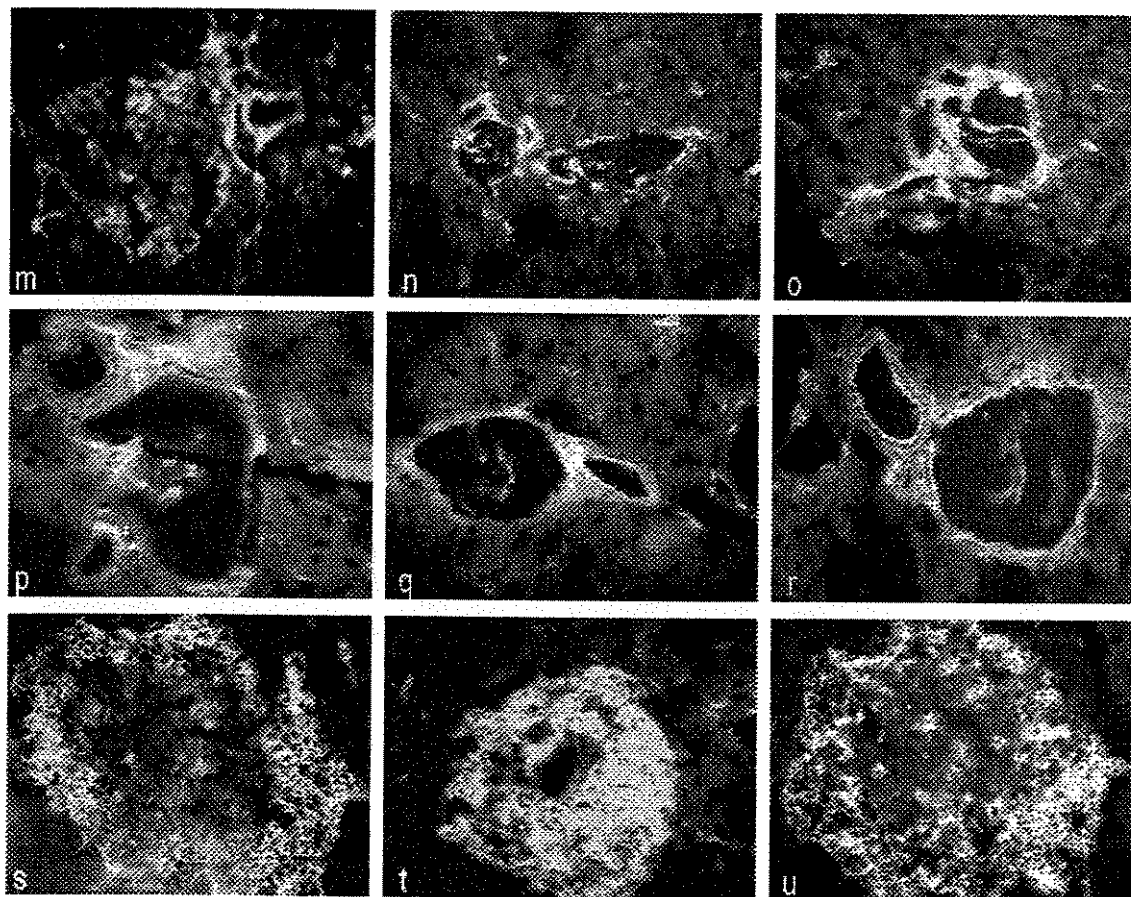
inflamatório intenso composto por macrófagos ocupando aproximadamente 50% da área insular (Prancha II - figura s) observou-se predomínio de células CD4<sup>+</sup> nos infiltrados inflamatórios invadindo toda área da ilhota (Prancha II – figura t). Por outro lado, a marcação observada em células CD8<sup>+</sup> exibiu padrão semelhante àquele observado para macrófagos (Prancha II – figura u).

**PRANCHA I – Imunoistoquímica para detecção de linfócitos T CD4, CD8 e macrófagos em camundongos NOD nos grupos controle.**



- **Grupo Cm não-diabético:** (a) células CD11<sup>+</sup> localizadas predominantemente na região perivascular; (b) células CD4<sup>+</sup> formando infiltrado perivascular e pequeno conjunto de células CD8<sup>+</sup>.
- **Grupo Cm diabético:** (d) observa-se grande número de macrófagos invadindo a ilhota de Langerhans; por outro lado, há um pequeno número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (e) e maior detecção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (f) localizados circundando a ilhota.
- **Grupo Cf não-diabético:** (g) infiltrado perivascular de macrófagos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> (h) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (i) mais intenso.
- **Grupo Cf diabético:** observa-se aumento substancial do número de células CD11<sup>+</sup> (j), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (k) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (l). Ao contrário dos demais grupos, a localização destas células é predominantemente insular.

**PRANCHA II – Imunoistoquímica para detecção de linfócitos T CD4, CD8 e macrófagos em camundongos NOD tratados com testosterona.**



- **Grupo Ts1** : Presença de pequena quantidade de células CD11<sup>+</sup> (m), CD4<sup>+</sup>(n) e células CD8<sup>+</sup> na região perivascular (o)
- **Grupo Ts2** : Observa-se menor número de macrófagos CD11<sup>+</sup> (p), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (q) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (r), localizados predominantemente em região perivascular.
- **Grupo Tm** : Presença de intenso infiltrado inflamatório composto por macrófagos localizados predominantemente em região peri-insular (s); enquanto há predomínio de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na região central da ilhota de Langerhans (t) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> dispersos por toda ilhota (u).

#### **4.4. Efeitos da administração de testosterona sobre a expressão de citocinas no pâncreas e células esplênicas in vivo:**

Para avaliação do efeito do tratamento com testosterona, realizou-se a detecção da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no pâncreas e em células esplênicas isoladas.

##### **4.4.1.Pâncreas:**

Nos animais não diabéticos do grupo Ts1, a expressão de IFN- $\gamma$  estava significativamente diminuída ( $5.2 \pm 1.5$ ) ( $p < 0.05$ ) quando comparado com o grupo controle fêmea ( $12.2 \pm 5.0$ ) e níveis similares ao grupo macho ( $5.3 \pm 1.4$ ). O grupo Ts2 mostrou expressão aumentado de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo controle de camundongos machos ( $9.1 \pm 2.8$ ) ( $p < 0.01$ ), no entanto, apresentou menor expressão comparado ao grupo controle de camundongos fêmeas ( $12.2 \pm 5.0$ )(Figura 4A). Por outro lado, nos animais diabéticos IFN- $\gamma$  estava estatisticamente aumentado para o grupo Ts2 ( $13.9 \pm 3.9$ ) e o grupo Tm ( $16.6 \pm 4.0$ ) comparado com os controles macho e fêmea ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respectivamente). Entretanto, todos os animais dos grupos tratados com testosterona mostraram altos níveis de IFN- $\gamma$  (Ts1,  $9.8 \pm 2.8$ ; Ts2,  $13.9 \pm 3.9$ ; Tm,  $16.6 \pm 4.1$ ) ( $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ ) comparado com o grupo controle macho ( $4.4 \pm 0.7$ ). ( Figura 4B)

A expressão de mRNA IL-12 nos animais do grupo Ts1 (não diabético) tratado estava significativamente diminuído ( $75.1 \pm 10.5$ ) ( $p < 0.05$ ) comparado com os animais não diabéticos do grupo controle fêmea ( $94.5 \pm 10.8$ ). Entretanto, não mostrou diferença estatística entre os demais grupos de animais não diabéticos (Ts2,  $96.2 \pm$

14.5; Tm,  $81.1 \pm 16.0$ ; Cm,  $78.9 \pm 18.1$ ) (Figura 4C). Contudo, no grupo de animais diabéticos, a expressão de IL-12 estava aumentada em todos animais tratados (Ts1,  $90.5 \pm 12.3$ ; Ts2,  $113.3 \pm 12.4$ ; Tm,  $107.2 \pm 27.3$ ) ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo controle fêmea ( $74.0 \pm 15.1$ ) (Figura 4D).

Na análise de TNF- $\alpha$  entre os animais não diabéticos dos grupos tratados e controle não houve diferença nos níveis de expressão (Cm,  $72.6 \pm 19.5$ ; Cf,  $65.8 \pm 18.8$ ; Ts1,  $71.4 \pm 6.8$ ; Ts2,  $71.2 \pm 17.3$ ; Tm,  $81.2 \pm 14.1$ ) (Figura 4E). Por outro lado, nos animais diabéticos, TNF- $\alpha$  estava aumentado no grupo Ts1 ( $114.3 \pm 19.5$ ) e Ts2 ( $110.9 \pm 18.5$ ) ( $p < 0.05$ ) comparado ao grupo controle macho ( $65.3 \pm 12.9$ ) e controle fêmea ( $79.1 \pm 21.4$ ) (Figura 4F).



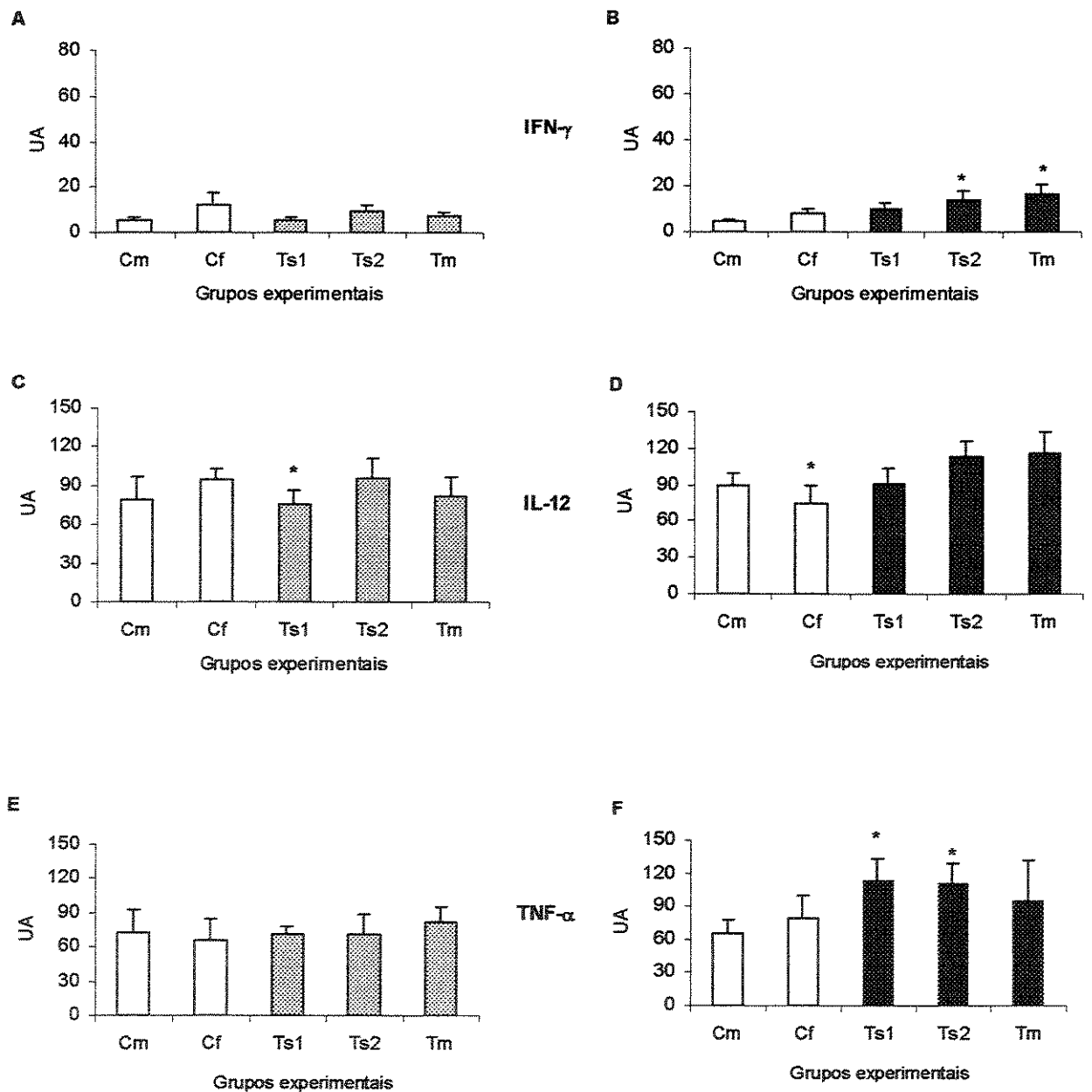
**Figura 4.** Expressão do mRNA de citocinas em pâncreas de camundongos NOD tratados com diferentes concentrações e períodos de testosterona. A, C e E animais não-diabéticos; B, D e F animais diabéticos. (A) Níveis de IFN- $\gamma$  estavam aumentados no grupo controle de fêmeas. (B) Em camundongos diabéticos o mRNA do IFN- $\gamma$  estava aumentado nos grupos Ts2 e Tm. Além disso, todos os camundongos tratados com testosterona que manifestaram o diabetes apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$ . (C) Os animais do grupo Ts1 apresentaram níveis menores que os níveis verificados nas fêmeas do grupo controle. (D) A expressão de IL-12 nos animais diabéticos evidencia níveis mais altos em todos os grupos tratados quando comparados aos animais do grupo controle de fêmeas (E). \*  $p < 0,05$

**Figura 4**

**PÂNCREAS**

**Não Diabéticos**

**Diabéticos**



#### **4.4.2. Células Esplênicas:**

Nos animais não diabéticos, a análise entre os grupos tratados somente o Ts1 ( $31.1 \pm 7.9$ ) mostrou aumento na expressão de IFN- $\gamma$  ( $p < 0.01$ ) comparado ao grupo controle macho ( $17.5 \pm 0.6$ ). Ao comparar o grupo controle fêmea ( $59.7 \pm 19.0$ ) e os grupos tratados (Ts1,  $31.1 \pm 7.9$ ; Ts2,  $16.7 \pm 2.1$ ; Tm,  $13.0 \pm 4.3$ ) a expressão de IFN- $\gamma$  estava estatisticamente diminuída ( $p < 0.01$ ) nos grupos Ts2 e Tm. Contudo, IFN- $\gamma$  estava significamente diminuído nos animais do grupo Ts2 comparado com Ts1 ( $p < 0.05$ ) (Figura 5A). Nos animais diabéticos, comparando o grupo controle macho ( $1.2 \pm 0.1$ ) com os animais tratados (Ts1,  $5.1 \pm 1.6$ ; Ts2,  $6.2 \pm 2.2$ ; Tm,  $12.8 \pm 3.9$ ), somente o grupo Tm mostrou aumento nos níveis de citocina ( $p < 0,001$ ) mas não apresentou diferença com o grupo controle fêmea ( $8.3 \pm 2.9$ ). A análise entre os grupos tratados, os animais dos grupos Tm e Ts1 apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0.01$ ). (Figura 5B)

A expressão de IL-12 nos animais não diabéticos mostrou diferença estatística entre os animais dos grupos tratados (Ts1,  $72.4 \pm 11.8$ ; Ts2,  $92.5 \pm 17.5$ ; Tm,  $84.8 \pm 14.4$ ) e grupos controle (Cm,  $72.3 \pm 5.4$  e Cf,  $70.9 \pm 7.4$ ). Entretanto, dentro dos grupos tratados, encontramos altos níveis de expressão de IL12 no grupo Ts2 comparado ao grupo Ts1 ( $p < 0.05$ ) (Figura 5C). Para o grupo de animais diabéticos, IL-12 mostra perfil similar (Cm,  $82.3 \pm 4.9$ ; Cf,  $78.9 \pm 16.0$ ; Ts1,  $61.3 \pm 12.8$ ; Ts2,  $100.9 \pm 1.6$ ; Tm,  $80.9 \pm 5.7$ ) mas com valor de  $p < 0.01$ . (Figura 5D)

Na avaliação da expressão de TNF- $\alpha$  nos animais não diabéticos dos grupos tratados (Ts1,  $73.6 \pm 19.3$ , Ts2,  $99.7 \pm 7.4$ ; Tm,  $78.6 \pm 14.4$ ), o grupo Ts2 ( $99.7 \pm 7.4$ ) estava

aumentada ( $p<0.05$ ) comparado com o grupo controle fêmea ( $77.0 \pm 10.9$ ) e no controle macho ( $80.8 \pm 8.5$ ). A comparação dentro dos grupos tratados, o grupo Ts2 apresentou aumento nos níveis de expressão em relação ao grupo Ts1 ( $p<0.05$ ) (Figura 5E). Nos animais diabéticos do grupo Ts2 ( $61.4 \pm 2.2$ ), TNF- $\alpha$  estava diminuído comparado com os grupos controle fêmea ( $87.0 \pm 11.3$ ) ( $p<0.05$ ) e Ts1 ( $100.7 \pm 1.1$ ) ( $p<0.01$ ) níveis próximos ao grupo controle macho ( $70.4 \pm 3.3$ ). Além disso, a análise dentro dos grupos tratados, Ts2 estava diminuída ( $p<0.05$ ) comparado com o grupo Tm. (Figura 5F).

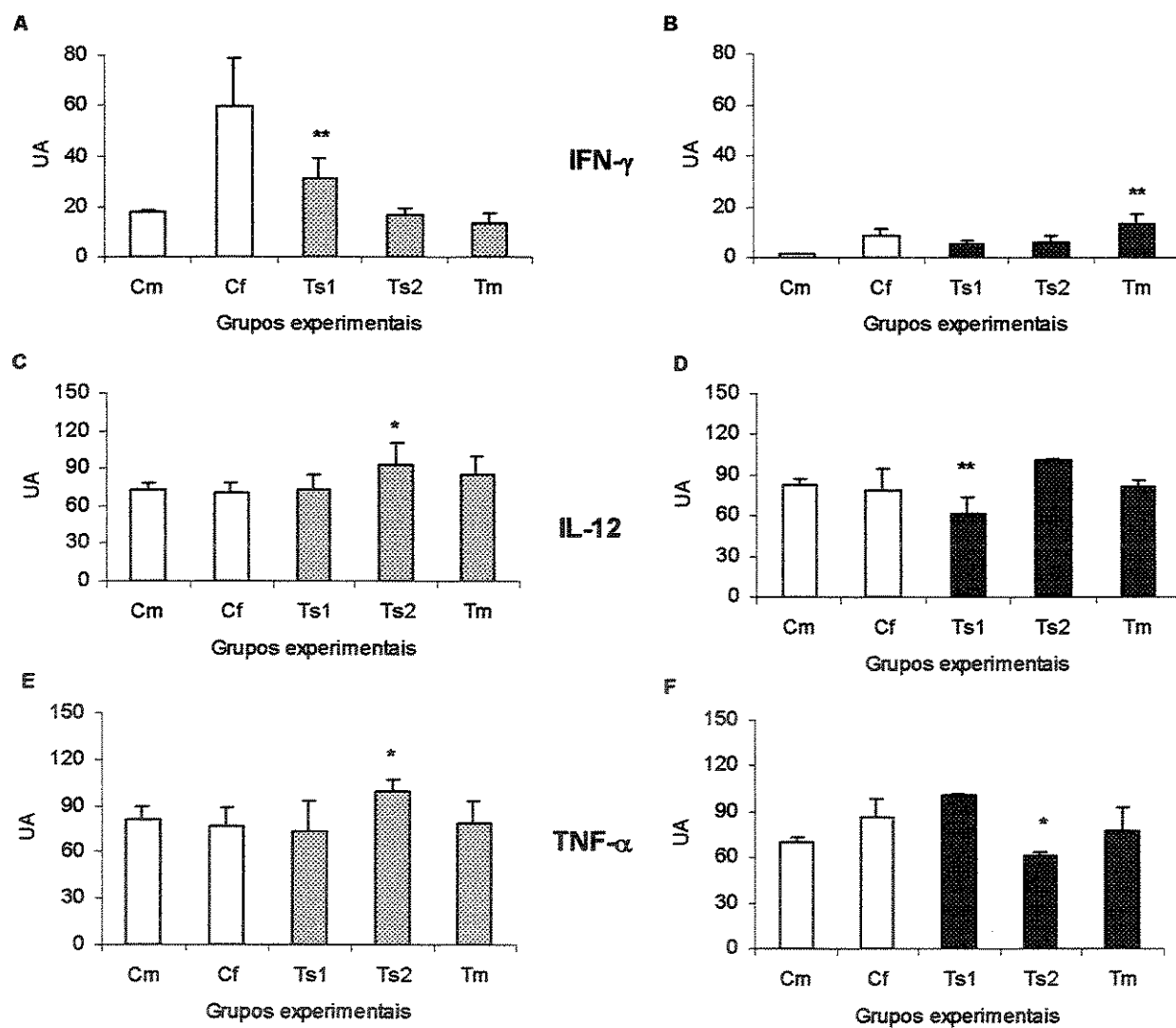
**Figura 5.** Expressão do mRNA de citocinas Th1 em células esplênicas de camundongo NOD tratados com diferentes concentrações e períodos de testosterona. A, C e E animais não diabéticos. B, D e F animais diabéticos. A) Os níveis de mRNA de IFN- $\gamma$  estavam aumentados no grupo controle fêmea comparados com os demais grupos, entretanto, na análise entre os grupos tratados, o grupo Ts1 apresentou maior nível. B) A análise entre os animais diabéticos o grupo Tm exibiu níveis aumentados na expressão de IFN em relação aos grupos controle e tratados. C) A expressão gênica de IL-12 não evidenciou diferenças entre os grupos experimentais, por outro lado, na comparação entre os grupos tratados, o Ts2 exibiu níveis mais elevados. D) Os animais diabéticos exibiram perfil semelhante aos observados em animais não diabéticos. E) Os níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  nos animais não diabéticos estavam maiores nos animais do grupo Ts2, em relação aos demais grupos. F) Nos animais diabéticos, o grupo Ts2 exibiu níveis reduzidos de TNF- $\alpha$ . Valores representando média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

**Figura 5**

**CÉLULAS ESPLÊNICAS**

**Não Diabéticos**

**Diabéticos**



#### **4.5. Ensaio de Viabilidade**

O efeito da testosterona na viabilidade celular foi estudada nas células esplênicas obtidas no camundongo fêmea NOD. As células foram mantidas em culturas por 24, 48 e 72 horas após estímulo com diferentes concentrações de testosterona : 5, 10, 20, 30 nM. As células do controle não foram estimuladas com testosterona. Os resultados obtidos demonstram que a testosterona nas concentrações utilizadas e nos tempos estipulados não interfere na viabilidade celular (Figura 6)

#### **4.6.Efeitos da administração de testosterona sobre a expressão de citocinas nas células esplênicas *in vitro*:**

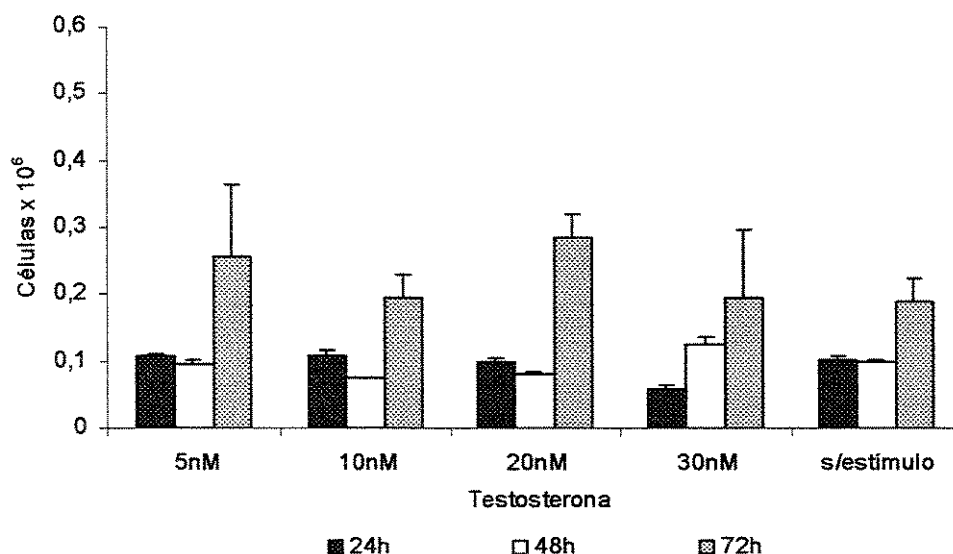
Para a análise da modulação da testosterona na expressão de citocinas Th1 nas células esplênicas, as células foram cultivadas sobre estímulo da testosterona e comparamos o efeito entre as diferentes concentrações com o controle não estimulado (Figura 7). A testosterona, *in vitro*, modula a expressão de RNA de citocinas Th1 dependente de dose e tempo. IFN- $\gamma$  estava aumentada particularmente nas concentrações de 20 and 30nM, em 48 horas ( $p<0,01$ ) comparado com as células não estimuladas. Por outro lado, a expressão de IFN- $\gamma$  estava diminuída nas concentrações de 5nM ( $p<0,05$ ) e 10nM ( $p<0,01$ ) em 72 horas em relação a células não estimuladas, sugerindo efeito inibitório da testosterona na expressão dessa citocina (Figura 7A). A comparação da expressão de IL-12 nas diferentes concentrações e tempos mostraram diminuição da expressão de IL-12 ( $p<0.01$ ) , em 5nM e 10 nM, em 48 horas e 5nM e 30nM ( $p<0,01$ ) em 72 horas (Figura 7B). Em

relação a expressão de TNF- $\alpha$ , encontramos aumento ( $p<0,01$ ) nas concentrações de 5nM e 10nM testosterona, para 48 horas, 10 nM para 24 horas e 30 nM ( $p<0.01$ ) para 72 horas comparado com o não estimulado. Por outro lado, os níveis de expressão estavam diminuídos na concentração de 5nM em 72 horas ( Figura 7C) . A expressão de IL-10 estava diminuída nas concentrações de 5, 20 e 30nM ( $p<0,01$ ) em 24 horas comparados com as células não estimuladas e aumentadas na concentração de 5 nM em 48 horas. Entretanto, comparado com as células não estimuladas a expressão de IL-10 estava diminuída ( $p<0.01$ ) em todos os grupos estimulados no tempo de 72 horas (Figura 7D).

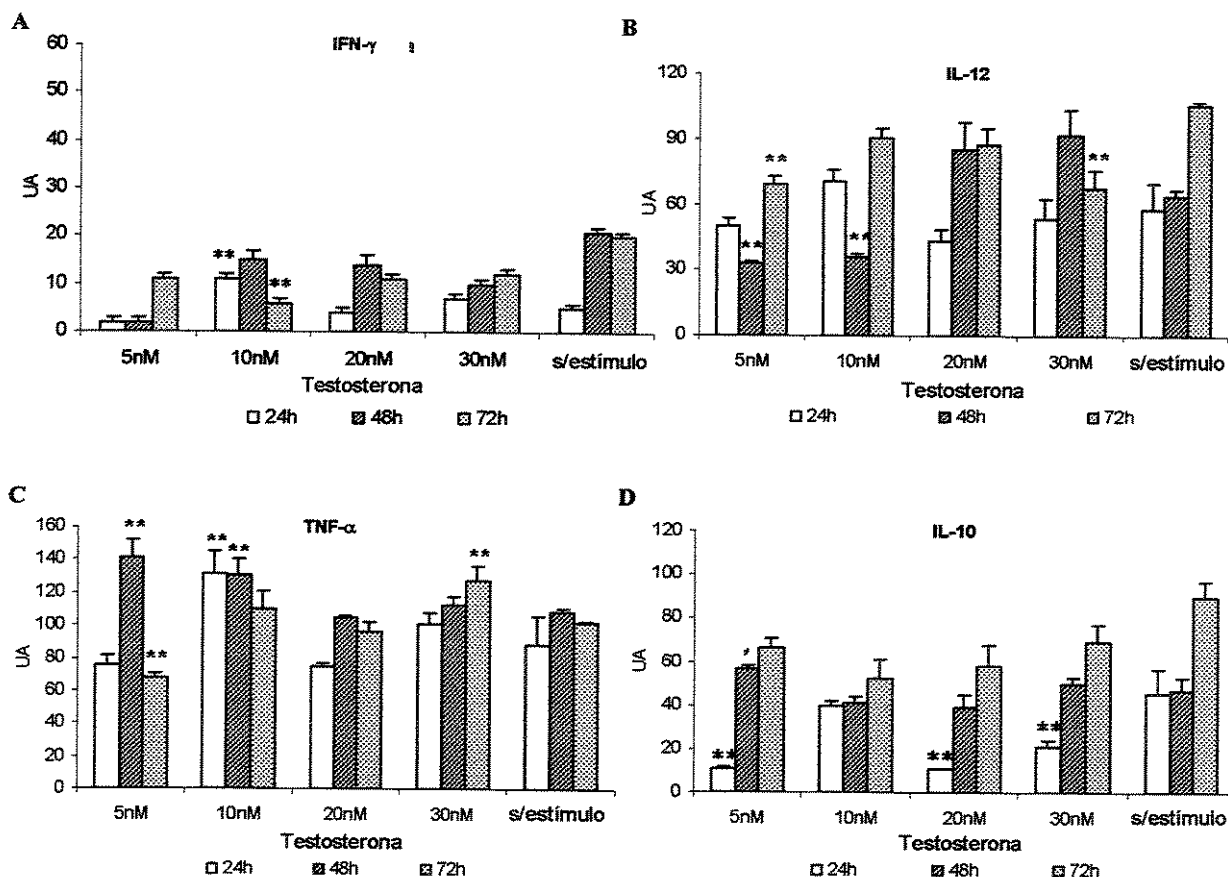
#### **4.7. Ativação da Via Jak-Stat**

Para determinar se a administração de testosterona in vivo exerce efeitos nas proteínas Jak-Stat, importantes elementos envolvidos no sinal de transdução de citocina, as ativações foram determinadas pela fosforilação nas células esplênicas de animais injetados com testosterona. Os ensaios sugeriram que os efeitos da testosterona são dose e tempo dependentes na ativação da via Jak-Stat. A fosforilação da Tyk2, Jak2 e Stat3 foram detectados no tempo zero (controle salina), sugerindo um estado basal de ativação no baço do camundongo NOD .Para a concentração de 1 $\mu$ M testosterona injetada, os níveis de fosforilação deTyk2 estava reduzida comparada com o tempo 0 (tempo zero), 5 e20 nM ( $p<0.01$ ). Entretanto, na concentração de 20nM de testosterona Jak2 estava aumentada ( $p<0.01$ ) e Stat3 estava diminuída ( $p<0.001$ ) quando comparada com outras concentrações (Figura 8). Não observamos a ativação da Stat4.

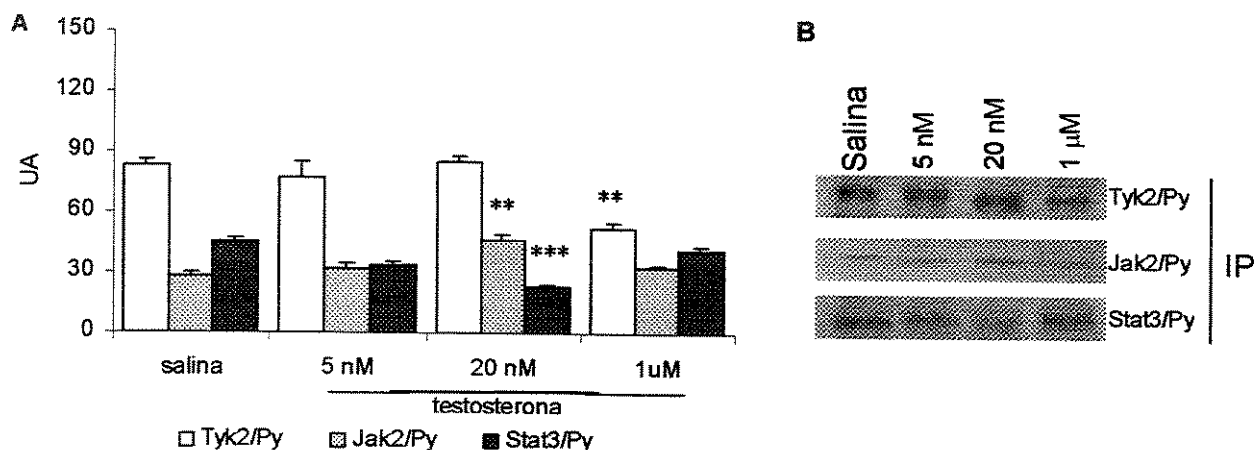




**Figura 6.** Ensaio de viabilidade pelo MTT. Culturas de células esplênicas de camundongos NOD não diabéticos, com 8 semanas, mantidas por 24, 48 e 72 horas com adição de testosterona nas concentrações de 5, 10, 20, 30 nM e não estimuladas. Os resultados demonstram que não há alterações na viabilidade celular em decorrência da ação da testosterona.



**Figura 7. Expressão de citocinas *in vitro*.** Células Esplênicas de camundongos NOD com 8 semanas de vida, cultivadas com adição de testosterona por 24, 48 e 72 horas. A) Expressão mRNA IFN- $\alpha$ , as células estimuladas com 10nM de testosterona durante 24h encontra-se aumentada quando comparadas com as células não estimuladas. B) Na análise da expressão gênica de IL-12 observou-se efeito inibitório da adição de testosterona ao meio nas concentrações de 5 e 10nM na cultura de 48h, e nas concentrações de 5nM e 30nM após 72h. C) Os níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  estavam aumentados nas culturas de 48h nas concentrações de 5nM, 10nM em culturas de 24h e 30nM nas culturas de 72h. D) Observou-se diminuição na expressão gênica de IL-10 nas concentrações de 5, 20 e 30nM em culturas mantidas por 24h e por 72h na concentração de 30nM quando comparados as culturas não estimuladas. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão da triplicata de culturas. Os dados representam três experimentos separados utilizando células esplênicas de três animais diferentes. \*,  $p < 0,05$  e \*\*,  $p < 0,01$ , comparação dos tratamentos *in vitro* foi feito utilizando ANOVA.



**Figura 8.** Efeito da testosterona na ativação de Tyk2, Jak2 e Stat3 no baço de camundongos NOD. Homogeneizado de baço obtido de fêmeas não diabéticas na 8ª semana de vida submetido à eletroforese em SDS-Page. Imunoprecipitado e “immunoblotting” realizado com anticorpo anti-fosfotirosina. Autoradiografia de 6 experimentos que foram digitalizados. A intensidade das bandas foram expressas em unidades arbitrárias (UA), o gráfico representa médias  $\pm$  desvio padrão. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$

## 5. DISCUSSÃO

---

Trabalhos anteriores demonstraram a existência de receptores para hormônios sexuais em linfócitos, timócitos humanos (COHEN *et al.*, 1983; WEUSTEN *et al.*, 1986; KENDALL *et al.*, 1990), tecido tímico fetal (SCREPANTI *et al.*, 1982), células mononucleares periféricas sanguíneas (SCREPANTI *et al.*, 1982; DANIEL *et al.*, 1983) e timócitos intratímicos resistentes a esteróides (PEARCE *et al.*, 1981). Recentemente foi demonstrado que andrógenos participam do desenvolvimento de precursores linfóides (OLSEN & KOVACS, 2001). Existem evidências, que o mecanismo de ação dos esteróides sexuais no sistema imune siga duas vias. Primeiro, por via direta, através de receptores em linfócitos, monócitos e macrófagos, segundo, por via indireta, pela liberação de hormônio tímico (timosina B4) o qual ativaria hormônios hipotalâmicos e hipofisários (REBAR, *et al.*, 1982), ou ainda, aumentando a atividade supressora sobre o linfócito T (BHALLA, 1989). Na tentativa de entender a influência dos hormônios sexuais no contexto inflamatório autoimune, têm sido utilizados em diferentes modelos e protocolos experimentais. Na linhagem de camundongos NOD, o dimorfismo sexual está relacionado à maior incidência do diabetes mellitus autoimune nas fêmeas. A castração do camundongo NOD macho aumenta a incidência do diabetes enquanto, a castração da fêmea reduz a incidência da doença (HAWKINS *et al.*, 1993; FOX, 1992).

A administração de testosterona a NOD fêmea não castrada parece protegê-la do desenvolvimento do diabetes (HAWKINS *et al.*, 1993). Nossos resultados estão de acordo com estas observações e estão associados à dose de testosterona administrada. O efeito da testosterona é melhor observado em altas doses (348 $\mu$ M)

com frequência de administração semanal, o que eleva os níveis plasmáticos deste hormônio a níveis próximos aos do macho.

No camundongo NOD a insulite inicia na 4ª semana de vida com progressão visualizada pelo aumento de células inflamatórias infiltrativas que ocorre em paralelo à destruição das células  $\beta$  nas ilhotas pancreáticas (SIGNORE *et al.*, 1989; KIKUTANI & MAKINO, 1992; PAPACCIO *et al.*, 1993). Nos animais tratados com testosterona, o índice de insulite, representativo da gravidade do comprometimento da ilhota, estava diminuído. Conforme o esperado, altas doses de testosterona administradas semanalmente exerceram controle mais efetivo sobre a incidência do diabetes. Embora, os animais tratados com doses menos concentradas de testosterona (174 $\mu$ M) apresentem índices de diabetes maiores que os animais tratados com altas doses, a manifestação do diabetes foi postergado com início semelhante ao ocorrido nos machos, quando comparada aos animais tratados com salina.

O fenótipo das subpopulações de linfócitos T, associados a insulite do diabetes tipo 1, foi descrito por KIKUTANI e MAKINO(1992). Em adição, outros autores (WONG *et al.*, 1997) descreveram as propriedades sinérgicas das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na insulite e desenvolvimento do diabetes. BEDOSSA *et al* (1989) demonstraram haver aumento na proporção de células CD8<sup>+</sup>, macrófagos, linfócitos B e células NK (KAY *et al.*, 1997) no infiltrado em associação a destruição das células  $\beta$  e progressão do diabetes. Nossos resultados demonstraram que a destruição das células  $\beta$  estava relacionada com o aumento de células CD8<sup>+</sup> e presença de macrófagos.

Nos animais tratados com diferentes concentrações de testosterona a proporção de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> estava associada à dose administrada, incidência da doença e índice de destruição das ilhotas pancreáticas. Os animais tratados com testosterona na dose semanal de 348µM apresentaram menor número de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e macrófagos.

A participação das citocinas no processo da lesão e suas propriedades funcionais estão condicionadas a diferentes fatores, como o microambiente inflamatório, origem do estímulo e o equilíbrio das propriedades sinérgicas e antagônicas das citocinas presentes no compartimento inflamado.

Baseados nestas considerações, analisamos a expressão do mRNA de citocinas em pâncreas e células esplênicas do camundongo NOD tratado com testosterona, durante 24 semanas (da 4<sup>a</sup> a 28<sup>a</sup> semana de vida). Experimentos adicionais *in vitro* foram realizados para averiguar os efeitos da testosterona sobre a expressão de citocinas em células esplênicas.

Existe uma quantidade substancial de informações que salientam os efeitos dos hormônios sexuais no equilíbrio da produção de citocinas Th1/Th2 e, por conseguinte, no desenvolvimento do diabetes do camundongo NOD. Estudos prévios sugerem que a resposta autoimune direcionada contra a célula  $\beta$  da ilhota de Langerhan, possa ser mediada pelo linfócito T auxiliar do tipo 1 (Th1), responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias e responsável pela fase efetora da insulite no camundongo NOD ( PILSTROM *et al.*, 1995; BRADLEY *et al.*, 1999; HIRAI *et al.*, 2000). Trabalhos anteriores em nosso laboratório, em concordância com outros, demonstraram a presença de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nas ilhotas dos camundongos

NOD nos estágios iniciais do processo inflamatório, correlacionando o aumento na expressão destas citocinas com a insulite destrutiva (TOYODA *et al.*, 1994; MUIR *et al.*, 1995; RABINOVITCH, 1998; HIRAI *et al.*, 2000; VENTURA-OLIVEIRA, 2002).

Juntos, os resultados do presente trabalho reforçam o efeito da testosterona sobre a expressão das citocinas no pâncreas de camundongos NOD tratados, diabéticos e não diabéticos. A diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , indicam que a testosterona modula as citocinas pró-inflamatórias no camundongo NOD. Estes resultados são corroborados pela expressão aumentada destas citocinas nos camundongos do grupo controle não diabético. Por outro lado, considerando as células esplênicas como compartimento periférico ao estudo do efeito da testosterona na expressão de citocinas pelo sistema imunológico nós observamos, em oposição ao pâncreas no animal não diabético tratado com testosterona, o aumento do IFN- $\gamma$ . Além disso, não foram encontradas diferenças na expressão da IL-12. No camundongo NOD, linfócitos T CD4<sup>+</sup> diferenciam-se em linfócitos Th1 produtores de IFN- $\gamma$  em resposta à estimulação policlonal. A ausência de IL-12 e IFN- $\gamma$ , não está relacionado com a capacidade de estimular a divisão celular. A IL-2 é necessária para diferenciação em células Th1 e produção de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando atuação desta citocina de forma autócrina na diferenciação celular, o que pode representar susceptibilidade genética que favorece os linfócitos T autoreativos produtores de IFN- $\gamma$  no camundongo NOD (ZHOU *et al.*, 2003). Embora não tenhamos verificado a expressão de IL-2 no pâncreas e baço, nossos achados sugerem diferenças na modulação das citocinas em ambos os compartimentos em resposta ao estímulo da testosterona exógena.



Estas observações foram confirmadas pelo estudo *in vitro* da expressão de citocinas em células esplênicas cultivadas com testosterona. Contudo, ao contrário de estudos prévios, nós não verificamos o aumento da IL-10 sob estímulo da testosterona (LIVA & VOSKUHL, 2001). Esta citocina estava diminuída em todas as concentrações de andrógeno utilizadas. A aparente discrepância entre os estudos sugere diferentes mecanismos na modulação das citocinas em condições fisiológicas e patológicas.

Com relação aos possíveis efeitos da testosterona na ativação da Jak-Stat nossos resultados demonstraram a dose-dependência no estímulo a fosforilação de Jak2 e na fosforilação de Tyk2 e Stat3 reduzidas. Em nossos experimentos não foi possível detectar a ativação da Stat4.

Estudos recentes utilizando o camundongo NOD sugerem o efeito de estrógenos na ativação de Stat4 induzida pela IL-12, enquanto a testosterona não altera a ativação de Stat4 (BAO *et al.*, 2002).

Por outro lado, a expressão de Stat3 diminuída em linfócitos T após hemorragia traumática, é restaurada pelo pré-tratamento com flutamida (um bloqueador do receptor andrógeno), sugerindo ação da testosterona na Stat3 (SAMY *et al.*, 2000). Estes estudos reiteram nossos dados, que demonstram a ativação reduzida de Stat3 em células esplênicas sob tratamento com testosterona.

Em resumo, o presente trabalho é o primeiro relato demonstrando o possível efeito modulatório da testosterona na ativação da Jak2 / Tyk2 - Stat3, o que pode constituir um fator adicional no controle da produção de citocinas pró-inflamatórias e a manifestação do diabetes no modelo do diabetes tipo 1 em camundongo NOD.

## CONCLUSÕES

---

1. O efeito da testosterona sobre a incidência do diabetes nos camundongos fêmea NOD estava relacionado com a dose e o intervalo da administração do esteróide
2. Na insulite, animais tratados com testosterona na dose de 348  $\mu$ M apresentaram índice de lesão pancreática menor em relação aos demais grupos tratados e aos grupos controles.
3. Independentemente da dose administrada, a testosterona modula negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ ) no pâncreas. Entretanto, nas células esplênicas não foi observado alteração na expressão dessas citocinas, contudo, nos animais tratados observou-se aumento nos níveis de IFN- $\gamma$
4. A ação da testosterona sobre ativação dos fatores de transcrição ( via Jak/Tyk-Stat) mostra-se dose dependente, com o aumento da fosforilação de Jak2 e diminuição de Stat3 juntamente com Tyk2. Esses dados são inéditos e abrem novas linhas de investigação sobre os efeitos dos esteróides na modulação dos sinais de linfócitos na resposta imune.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

1. Alberti KG, Zimmet PZ: New diagnostic criteria and classification of diabetes—again? **Diabet Med** 15(7): 535-536, 1998.
2. Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N: Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. **Am J Pathol** 121(3): 531-551, 1985.
3. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C: Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. **Cell** 74(2): 237-244, 1993.
4. Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, Gibbs KA, Shah SC, Bu DF, Erlander MG, Tobin AJ, Maclaren NK: Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. **Lancet** 339(8791): 458-459, 1992.
5. Atkinson MA: Mechanisms underlying the loss of self tolerance in NOD mice. **Res Immunol** 148(5): 301-306, 1997.
6. Bach JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocr Rev** 15(4): 516-542, 1994.
7. Bach JF, Mathis D: The NOD mouse. **Res Immunol** 148(5): 285-286, 1997.
8. Bacon CM MD, Ortaldo JR, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA.: Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. **J Exp Med** 181(1): 399-404, 1995.

9. Bacon CM PEr, Ortaldo JR, Rees RC, Lamer AC, Johnston JA, O'Shea JJ.: Free in PMC Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 92(16): 7307-7311, 1995.
10. Baekkeskov S AH, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P, Camilli PD.: Abstract Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature** 347((6289)): 151-156, 1990.
11. Bao M, Yang Y, Jun HS, Yoon JW: Molecular mechanisms for gender differences in susceptibility to T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **J Immunol** 168(10): 5369-5375, 2002.
12. Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C: Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. **Eur J Immunol** 19(10): 1947-1951, 1989.
13. Bernard NF, Ertug F, Margolese H: High incidence of thyroiditis and anti-thyroid autoantibodies in NOD mice. **Diabetes** 41(1): 40-46, 1992.
14. Bhalla AK: Hormones and the immune response. **Ann Rheum Dis** 48(1): 1-6, 1989.
15. Boechat LH, Vilella CA, Zollner RL: Effect of iodide on Fas, Fas-ligand and Bcl-w mRNA expression in thyroid of NOD mice pretreated with methimazole. **Braz J Med Biol Res** 35(3): 289-295, 2002.
16. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D: Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. **Lancet** 2(7892): 1279-1283, 1974.

17. Bottazzo GF, Genovese S, Bosi E, Dean BM, Christie MR, Bonifacio E: Novel considerations on the antibody/autoantigen system in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Ann Med** 23(4): 453-461, 1991.
18. Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krah T, Patstone G, Woolf N, Campbell IL, Sarvetnick N: Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. **J Immunol** 162(5): 2511-2520, 1999.
19. Campbell IL, Iscaro A, Harrison LC: IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. **J Immunol** 141(7): 2325-2329, 1988.
20. Carter LL, Murphy KM: Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells. **J Exp Med** 189(8): 1355-1360, 1999.
21. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA, Jr., Matis LA: The role of Fas in autoimmune diabetes. **Cell** 89(1): 17-24, 1997.
22. Cho SS BC, Sudarshan C, Rees RC, Finbloom D, Pine R, O'Shea JJ.: Abstract Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. **J Immunol** 157(11): 4781-4789, 1996.
23. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem** 162(1): 156-159, 1987.

24. Cohen JH, Danel L, Cordier G, Saez S, Revillard JP: Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. **J Immunol** 131(6): 2767-2771, 1983.
25. Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR, Jr., McDaniel ML: Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(5): 1731-1735, 1993.
26. Correale J, Arias M, Gilmore W: Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. **J Immunol** 161(7): 3365-3374, 1998.
27. Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT: Estrogens, the immune response and autoimmunity. **Clin Exp Rheumatol** 13(2): 217-226, 1995.
28. Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carraud C: Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. **Eur J Immunol** 27(11): 2854-2862, 1997.
29. Danel L, Souweine G, Monier JC, Saez S: Specific estrogen binding sites in human lymphoid cells and thymic cells. **J Steroid Biochem** 18(5): 559-563, 1983.
30. Darnell JE Jr, Stark GR.: Abstract Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science** 264(5164): 1415-1421, 1994.
31. Drouin P, Blicke JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ, Plouin PF, Daninos JM, Balarac N, Sauvanet JP: [Diagnosis and classification of diabetes mellitus: the new criteria]. **Diabetes Metab** 25(1): 72-83, 1999.



32. Durinovic-Bellò IH, M.; Ziegler, A.G.: Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. **Diabetes** 45: 795-800, 1996.
33. Eisenbarth GS: Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med** 314(21): 1360-1368, 1986.
34. Eizirik DL, Sandler S, Palmer JP: Repair of pancreatic beta-cells. A relevant phenomenon in early IDDM? **Diabetes** 42(10): 1383-1391, 1993.
35. Eizirik DL, Flodstrom M, Karlén AE, Welsh N: The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. **Diabetologia** 39(8): 875-890, 1996.
36. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T: A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia** 44(12): 2115-2133, 2001.
37. Erlander MG, Tobin AJ: The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. **Neurochem Res** 16(3): 215-226, 1991.
38. Faulkner-Jones BE, Dempsey-Collier M, Mandel TE, Harrison LC: Both TH1 and TH2 cytokine mRNAs are expressed in the NOD mouse pancreas in vivo. **Autoimmunity** 23(2): 99-110, 1996.
39. Fox HS: Androgen treatment prevents diabetes in nonobese diabetic mice. **J Exp Med** 175(5): 1409-1412, 1992.
40. Fu XY: A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon alpha-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). **Cell** 70(2): 323-335, 1992.

41. Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Cameiro EM, Velloso LA: Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. **J Physiol** 552(Pt 1): 149-162, 2003.
42. Gurlo T, Kawamura K, von Grafenstein H: Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8<sup>+</sup> T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway. **J Immunol** 163(11): 5770-5780, 1999.
43. Harrison LC, Chu SX, DeAizpurua HJ, Graham M, Honeyman MC, Colman PG: Islet-reactive T cells are a marker of preclinical insulin-dependent diabetes. **J Clin Invest** 89(4): 1161-1165, 1992.
44. Hartemann AH, Richard MF, Boitard C: Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic (NOD) mice. **Clin Exp Immunol** 116: 225-230, 1999.
45. Hawkins T, Gala RR, Dunbar JC: The effect of neonatal sex hormone manipulation on the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. **Proc Soc Exp Biol Med** 202(2): 201-205, 1993.
46. Hayward AR, Shreiber M: Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. **J Immunol** 143(5): 1555-1559, 1989.
47. Hirai H, Kaino Y, Ito T, Kida K: Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets of nonobese diabetic mice. **J Pediatr Endocrinol Metab** 13(1): 91-98, 2000.

48. Homo-Delarche F, Fitzpatrick F, Christeff N, Nunez EA, Bach JF, Dardenne M: Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. **J Steroid Biochem Mol Biol** 40(4-6): 619-637, 1991.
49. Hou J SU, Henzel WJ, Wong, SC MS: Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. **Immunity** 2: 231-239, 1995.
50. Ihle J: No abstract STATs: signal transducers and activators of transcription. **Cell** 84(3): 331-334, 1996.
51. Ingelsson E, Saldeen J, Welsh N: Islet expression of perforin, Fas/Apo-1 and interleukin-1 converting enzyme (ICE) in non-obese diabetic (NOD) mice. **Immunol Lett** 63(3): 125-129, 1998.
52. Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwahashi H, Moriwaki M, Nakajima H, Miyagawa J, Namba M, Makino S, Nagata S, Kono N, Matsuzawa Y: Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **J Exp Med** 186(4): 613-618, 1997.
53. Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, Tomita K, Namba M, Kuwajima M, Noguchi T, Tsujimoto Y, Matsuzawa Y: Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. **Diabetologia** 39(5): 530-536, 1996.
54. Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW: The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **J Exp Med** 189(2): 347-358, 1999.

55. Kawamura T, Nagata M, Utsugi T, Yoon JW: Prevention of autoimmune type I diabetes by CD4<sup>+</sup> suppressor T cells in superantigen-treated non-obese diabetic mice. **J Immunol** 151(8): 4362-4370, 1993.
56. Kay TW, Chaplin HL, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE: CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. **Res Immunol** 148(5): 320-327, 1997.
57. Keller RJ: Cellular immunity to human insulin in individuals at high risk for the development of type I diabetes mellitus. **J Autoimmun** 3(3): 321-327, 1990.
58. Kendall MD, Fitzpatrick FT, Greenstein BD, Khoylou F, Safieh B, Hamblin A: Reversal of ageing changes in the thymus of rats by chemical or surgical castration. **Cell Tissue Res** 261(3): 555-564, 1990.
59. Kikutani H, Makino S: The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Adv Immunol** 51: 285-322, 1992.
60. Kim NH KD, Choi KM, Baik SH, Choi DS.: Serum insulin, proinsulin and proinsulin/insulin ratio in type 2 diabetic patients: as an index of beta-cell function or insulin resistance. **Korean J Intern Med** 15(3): 198-201, 2000.
61. Kim YH, Kim S, Kim KA, Yagita H, Kayagaki N, Kim KW, Lee MS: Apoptosis of pancreatic beta-cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes. **Eur J Immunol** 29(2): 455-465, 1999.
62. Kumar N, Shan LX, Hardy MP, Bardin CW, Sundaram K: Mechanism of androgen-induced thymolysis in rats. **Endocrinology** 136(11): 4887-4893, 1995.

63. Lafferty KJ: Immunobiology of autoimmune diabetes. **Res Immunol** 148(5): 313-319, 1997.
64. Lampeter EF, Signore A, Gale EA, Pozzilli P: Lessons from the NOD mouse for the pathogenesis and immunotherapy of human type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia** 32(10): 703-708, 1989.
65. Lenard MJ: The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. **Res Immunol** 9: 1-5, 1997.
66. Lin JX, Mietz J, Modi WS, John S, Leonard WJ: Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. **J Biol Chem** 271(18): 10738-10744, 1996.
67. Liva SM, Voskuhl RR: Testosterone acts directly on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to increase IL-10 production. **J Immunol** 167(4): 2060-2067, 2001.
68. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Katagiri K: Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. **Jikken Dobutsu** 30(2): 137-140, 1981.
69. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y: Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu** 29(1): 1-13, 1980.
70. Medina KL, Kincade PW: Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(12): 5382-5386, 1994.
71. Miller BJ, Apple MC, O'Neill JJ, Wicker LS: Both the Lyt2 and L3T4<sup>+</sup> T cell subset are required for the transfer of diabetes in non-obese diabetic mice. **J Immunol** 140: 52-58, 1998.

72. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N: Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. **J Clin Invest** 95(2): 628-634, 1995.
73. Muller M BJ, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur AG, Barbieri G, Witthuhn BA, Schindler C, Pellegrini S, Wilks AF, Ihle JN, Stark GR, Kerr IM: The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. **Nature** 366(6451): 129-135, 1993.
74. Nagata M, Santamaria P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon JW: Evidence for the role of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. **J Immunol** 152(4): 2042-2050, 1994.
75. Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB: The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. **Diabetes** 26(2): 100-112, 1977.
76. Nepom GT, Erlich H: MHC class-II molecules and autoimmunity. **Annu Rev Immunol** 9: 493-525, 1991.
77. Olsen NJ, Kovacs WJ: Effects of androgens on T and B lymphocyte development. **Immunol Res** 23(2-3): 281-288, 2001.
78. O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, Lund T, Kioussis D, Takei F, Baird J, Cooke A: Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD

- mice: effect of cell transfer and transgene expression. **Eur J Immunol** 21(5): 1171-1180, 1991.
79. Palmer JP, Cooney MK, Crossley JR, Hollander PH, Asplin CM: Antibodies to viruses and to pancreatic islets in nondiabetic and insulin-dependent diabetic patients. **Diabetes Care** 4(5): 525-528, 1981.
  80. Papaccio G, Chieffi Baccari G, Mezzogiorno V: In vivo effect of gangliosides on non-obese diabetic mice. **Acta Anat (Basel)** 147(3): 168-173, 1993.
  81. Papaccio G, Chieffi-Baccari G, Mezzogiorno V, Esposito V: Extraislet infiltration in NOD mouse pancreas: observations after immunomodulation. **Pancreas** 8(4): 459-464, 1993.
  82. Pavin E, Zollner R: Implantação da linhagem "NOD mice" (camundongos diabéticos não obesos) no Brasil: Contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino dependente e outras doenças autoimunes. **Arcq Bras Endo Metabol** 38: 105-108, 1994.
  83. Pilstrom B, Bjork L, Bohme J: Demonstration of a TH1 cytokine profile in the late phase of NOD insulinitis. **Cytokine** 7(8): 806-814, 1995.
  84. Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, Dinarello CA, Nerup J: Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes—evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. **Autoimmunity** 19(3): 169-178, 1994.
  85. Pozzilli PS, A.; Williams, A.J.K; Beales, P.E.: NOD mouse colonies around the world - recent facts and figures. **Immunol Today** 14: 193-196, 1993.

86. Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A: Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1. **Diabetes** 37(1): 133-136, 1988.
87. Qin HY, Sadelain MW, Hitchon C, Lauzon J, Singh B: Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. **J Immunol** 150(5): 2072-2080, 1993.
88. Rabinovitch A: An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev** 14(2): 129-151, 1998.
89. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL: Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. **Biochem Pharmacol** 55(8): 1139-1149, 1998.
90. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shi Y, Morgan AR, Bleackley RC: DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. **Diabetologia** 37(8): 733-738, 1994.
91. Rebar RW, Morandini IC, Petze JE, Erickson GF: Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males. **Biol Reprod** 27(5): 1267-1276, 1982.
92. Rohane PW, Shimada A, Kim DT, Edwards CT, Charlton B, Shultz LD, Fathman CG: Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. **Diabetes** 44(5): 550-554, 1995.
93. Rossini AA, Greiner DL, Friedman HP, Mordes JP: Immunopathogenesis of diabetes mellitus. **Diabetes Rev** 1: 46-75, 1993.



94. Saad MJ HL, de Carvalho DS, Galoro CA, Brenelli SL, Carvalho CR.: Abstract Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). **FEBS Lett** 370(1-2): 131-134, 1995.
95. Samy TS, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Androgen and estrogen receptors in splenic T lymphocytes: effects of flutamide and trauma-hemorrhage. **Shock** 14(4): 465-470, 2000.
96. Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, McIntyre B, Gregory A, Parslow T, Stewart T: Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. **Nature** 346(6287): 844-847, 1990.
97. Schuurs AH, Dietrich H, Gruber J, Wick G: Effects of sex steroid analogs on spontaneous autoimmune thyroiditis in obese strain chickens. **Int Arch Allergy Immunol** 97(4): 337-344, 1992.
98. Schwartz SL HC, Lucas C, Rosenblatt S, Rosenstock J, Whittier F, Wistran D, Riche C, Mulcahy WS.: Abstract Double-blind, placebo-controlled study of ramipril in diabetics with mild to moderate hypertension. **Clin Ther** 15((1)): 79-87, 1993.
99. Screpanti I, Gulino A, Pasqualini JR: The fetal thymus of guinea pig as an estrogen target organ. **Endocrinology** 111(5): 1552-1561, 1982.
100. Seemayer TA, Tannenbaum GS, Goldman H, Colle E: Dynamic time course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. III. Light-microscopic and

- ultrastructural observations of pancreatic islets of Langerhans. **Am J Pathol** 106(2): 237-249, 1982.
101. Shizuri JA, Taylor-Edwards C, Banks BA, Gregory Ak, Fathman CG: Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. **Science** 240: 659-662, 1998.
102. Signore A, Pozzilli P, Gale EA, Andreani D, Beverley PC: The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. **Diabetologia** 32(5): 282-289, 1989.
103. Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, *et al.*: Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. **Science** 263(5143): 92-95, 1994.
104. Suarez-Pinzon W SO, Bleackley RC, Elliott JF, Rajotte RV, Rabinovitch A.: Free Full Text Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. **Diabetes** 48(1): 21-28, 1999.
105. Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C: Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. **J Endocrinol** 126(1): 17-25, 1990.
106. Taniguchi S, Yanase T, Haji M, Ishibashi K, Takayanagi R, Nawata H: The antiobesity effect of dehydroepiandrosterone in castrated or noncastrated obese Zucker male rats. **Obes Res** 3 Suppl 5: 639S-643S, 1995.

107. Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW: Evidence that beta cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. **J Immunol** 163(3): 1562-1569, 1999.
108. Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW: Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. **Diabetes** 51(2): 311-316, 2002.
109. Thomas HE, Kay TW: Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. **Diabetes Metab Res Rev** 16(4): 251-261, 2000.
110. Tisch R, McDevitt H: Insulin-dependent diabetes mellitus. **Cell** 85(3): 291-297, 1996.
111. Tochino Y: The NOD mouse as a model of type I diabetes. **Crit Rev Immunol** 8(1): 49-81, 1987.
112. Toyoda H, Formby B, Magalong D, Redford A, Chan E, Takei S, Charles MA: In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. **Immunol Lett** 39(3): 283-288, 1994.
113. Tsai MJ OMB: Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Annu Rev Biochem** 63: 451-486, 1994.
114. Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL: Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. **Braz J Med Biol Res** 35(11): 1347-1355, 2002.
115. Viselli SM, Reese KR, Fan J, Kovacs WJ, Olsen NJ: Androgens alter B cell development in normal male mice. **Cell Immunol** 182(2): 99-104, 1997.

116. Watling D GD, Muller M, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Rogers NC, Schindler C, Stark GR, Ihle JN, Kerr IM: Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon- $\gamma$  signal transduction pathway. **Nature** 366(6451): 166-170, 1993.
117. Weusten JJ, Blankenstein MA, Gmelig-Meyling FH, Schuurman HJ, Kater L, Thijssen JH: Presence of oestrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes. **Acta Endocrinol (Copenh)** 112(3): 409-414, 1986.
118. Whitacre CC: Sex differences in autoimmune disease. **Nat Immunol** 2(9): 777-780, 2001.
119. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN: JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. **Cell** 74(2): 227-236, 1993.
120. Wong FS, Janeway CA, Jr.: The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. **Res Immunol** 148(5): 327-332, 1997.
121. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr.: CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. **J Exp Med** 183(1): 67-76, 1996.
122. Yale JF, Marliss EB: Altered immunity and diabetes in the BB rat. **Endocrinol** 110: 1825-1827, 1982.
123. Yamada K, Takane-Gyotoku N, Yuan X, Ichikawa F, Inada C, Nonaka K: Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. **Diabetologia** 39(11): 1306-1312, 1996.

124. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr.: Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. **Science** 264(5155): 95-98, 1994.
125. Zhou W, Zhang F, Aune TM: Either IL-2 or IL-12 is sufficient to direct Th1 differentiation by nonobese diabetic T cells. **J Immunol** 170(2): 735-740, 2003.
126. Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U: Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. **J Biol Chem** 272(9): 6073-6077, 1997.