



DENISE PEDROSA

EXPRESSÃO TEMPORAL DOS GENES DE REGENERAÇÃO
(REG1/REG2) E RECEPTORES TOLL-LIKE ASSOCIADOS COM O
ESTRESSE OXIDATIVO EM ILHOTAS DE CAMUNDONGOS NOD
(*NON-OBESE DIABETIC*) DURANTE A DIABETOGÊNESE

CAMPINAS

2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

DENISE PEDROSA

EXPRESSÃO TEMPORAL DOS GENES DE REGENERAÇÃO (REG1/REG2) E
RECEPTORES TOLL-LIKE ASSOCIADOS COM O ESTRESSE OXIDATIVO EM
ILHOTAS DE CAMUNDONGOS NOD (*NON-OBESE DIABETIC*) DURANTE A
DIABETOGENESE

Orientação: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de
título de Mestra em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
DENISE PEDROSA, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P343e Pedrosa, Denise, 1987-
Expressão temporal dos genes de regeneração (REG1/REG2) e receptores Toll-Like associados com o estresse oxidativo em ilhotas de camundongos NOD (*non obese diabetic*) durante a diabetogênese / Denise Pedrosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Camundongos endogâmicos NOD. 2. Diabetes mellitus tipo 1. 3. Estresse oxidativo. 4. Regeneração. I. Zollner, Ricardo de Lima, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Temporal expression of regenerating genes (REG1/REG2) and Toll-like receptors associated with oxidative stress in islets of NOD mice (*non obese diabetic*) during diabetogenesis.

Palavras-chave em inglês:

Mice, Inbred NOD

Diabetes mellitus, Type 1

Oxidative stress

Regeneration

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Luis Gustavo Romani Fernandes

Data de defesa: 13-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DENISE PEDROSA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

MEMBROS:

1. PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER



2. PROF. DR. WIRLA MARIA DA SILVA CUNHA TAMASHIRO



3. PROF. DR. LUIS GUSTAVO ROMANI FERNANDES



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13 de dezembro de 2013

Dedico

À Vida na Terra.

Agradecimento especial

Nestes 3 anos e meio de LIAE posso afirmar que tive um crescimento exponencial que jamais imaginei que pudesse ter. Recém-saída da faculdade, com alguns estágios no bolso e muito a aprender. Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Ricardo Zollner, por me aceitar em seu laboratório e confiar em meu trabalho. Em seu laboratório pude aprender a lidar com as mais diferentes situações, desde bons momentos até os ruins, porém acredito fielmente que eles me tornaram uma pessoa melhor. Obrigada por exigir tanto e por ter paciência em repassar seus ensinamentos, hoje vejo o quanto tudo isso fará diferença em minha vida profissional.

Agradecimentos

Aos Professores Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro e Dr. Luís Gustavo Romani Fernandes, por aceitarem compor a presente banca.

Aos meus queridos e amados pais. Cada um teve seu jeito de participar e sou eternamente grata. Obrigada querido pai pela paciência e por acreditar que eu poderia ir mais longe, sem o senhor eu jamais estaria onde estou, principalmente por aceitar que eu morasse sozinha aos 20 anos e por me manter (\$\$) nos períodos em que não havia bolsa de estudos ou quando ela era insuficiente. Obrigada mãezinha, por entender os períodos em que eu “sumia” e aguardar pacientemente por notícias. Seu sorriso enorme quando eu chegava em casa sempre me fortaleceu, assim como todos os “Ois” super empolgados e contentes a cada ligação. Amo muito vocês dois!

Ao meu eterno companheiro Murilo. Obrigada por aparecer em minha vida em um dos momentos de reviravolta mais difíceis de suportar. Seu amor e seu carinho me deram forças quando mais precisei e hoje posso afirmar que deixei de ser menina para me tornar mulher, a sua esposa. Muito obrigada, meu amor eterno.

Aos meus queridos irmãos Patrícia e Danilo. Pestes! Tão diferentes, mas iguais quando se tratava de bradar as boas notícias do meu trabalho. Amo muito vocês!

Ao meu amigo Fábio Arrojo, pela amizade sincera e inigualável. Você sabe o quanto é importante em minha vida e o quanto faço questão em te ver de cabelos brancos.

A querida Meg, por ser a mãezinha de trabalho. Muito obrigada pelo carinho, pela prontidão, pelas palavras e abraços quando o chão parecia desaparecer.

A Erika do CEMIB, pela disposição e por sempre dar um “jeitinho” em conseguir mais animais para os experimentos.

Ao colega André Herklotz, por confiar em meu trabalho e me ajudar sempre que foi preciso. Muito, muitíssimo obrigada!

A todos os colegas que fizeram ou ainda fazem parte da equipe do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental.

Ao Bruno, secretário da Pós-Graduação/Clinica Médica pela prontidão e atendimento.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	xii
RESUMO	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O Diabetes Mellitus	18
1.2 Camundongos NOD	19
1.3 Estresse Oxidativo	20
1.4 Regeneração de células β pancreáticas	22
1.5 Receptores <i>Toll-Like</i> (TLRs)	24
1.5.1 TLR2	27
1.5.2 TLR1 e TLR6	28
1.5.3 TLR4	28
1.5.4 TLR5	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivos Gerais	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Animais	34
3.2 Diagnóstico do Diabetes e Sacrifício dos Animais	35
3.3 Análise Morfológica.....	36
3.4 Técnica do Estresse Oxidativo.....	36
3.5 Extração de Ilhotas Pancreáticas.....	37
3.6 Extração de RNA Total (TRNA)	38
3.7 Avaliação quantitativa da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em Tempo Real ..	39
3.8 Análise dos Dados.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Desenvolvimento do Diabetes e Progressão da Insulite.....	43
Grau e Índice de Infiltrado nas Ilhotas Pancreáticas.....	45
4.1 Grau do Estresse Oxidativo nas Ilhotas Pancreáticas	48

4.2	Expressão Gênica dos Receptores <i>Toll-Like</i> (TLR2, TLR4, TLR5 E TLR6) em Ilhotas Pancreáticas empregando a Técnica de RT-PCR <i>One Step</i> em Tempo Real	51
4.3	Expressão Gênica dos Fatores de Regeneração Reg1 e Reg2 em Ilhotas pancreáticas empregando a Técnica de RT-PCR <i>One Step</i> em Tempo Real	53
5.	DISCUSSÃO.....	55
6.	CONCLUSÕES	64
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
8.	REFERÊNCIAS	68
9.	ANEXOS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
AP-1	Proteína de ativação 1
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
CFA	Adjuvante completo de Freund
COX	Enzima ciclooxygenase
CT	<i>Cycle threshold</i>
CuZnSOD	SOD com cobre e zinco
DAB	Diaminobenzidina
DC	Célula dendrítica
DM-1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
GPx	Glutathione peroxidase
HE	Hematoxilina e eosina
HRP	Peroxidase de armorácia
IFN	Interferon
IKK	<i>IkB kinase enzyme</i>
IL	Interleucina
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	Fator regulatório de interferon
JNK	<i>JUN N-terminal kinase</i>

LIAE	Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental
LP	Lipopetídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	<i>Leucine rich repeats</i>
MD-2	Proteína mielóide diferenciadora 2
MnSOD	Superóxido dismutase com manganês
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Myd88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NF-IL6	Fator nuclear interleucina 6
NO	Óxido nítrico
NOD	<i>Non obese diabetic</i>
NOS	Óxido nítrico sintase
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDC	Célula dendrítica plasmocitóide
PRR	Receptor reconhecedor de padrão
PSP	Proteína histônica
REDOX	Processo de redução
Reg	<i>Regenerating gene</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Scid	Imunodeficiência combinada grave
SOD	Superóxido dismutase
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
ssRNA	RNA de fita simples
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TIR	Receptor Toll/IL-1
TLR	Receptor <i>Toll-Like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulatório
TRIF	Domínio TIR indutor de interferon β

RESUMO

Empregando a linhagem de camundongos NOD (*non-obese diabetic*) de desenvolvimento espontâneo do diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) e a linhagem NOD.Scid como controle, foi realizada a análise da expressão dos genes de regeneração Reg1 e Reg2 e a sua relação com a expressão dos Receptores *Toll-Like* (TLRs), além da análise do estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas. Foram avaliados animais durante o desenvolvimento do diabetes com 2, 8 e 24 semanas de vida, além de camundongos diabéticos e do controle NOD.Scid. Houve aumento progressivo da insulite e do estresse oxidativo em função do tempo, além da diminuição drástica do número de ilhotas verificado em camundongos diabéticos. Os genes Reg1 e Reg2 apresentaram aumento da expressão em ilhotas pancreáticas de camundongos com 2 semanas de vida e nos animais diabéticos, assim como no controle NOD.Scid. Os receptores TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 foram expressos, com aumento significativo em animais com 8 e 24 semanas de vida, exceto para o TLR2 que apresentou expressão gênica reduzida em camundongos de 24 semanas de vida, sugerindo envolvimento na indução da fase de insulite. O animal diabético apresentou expressão reduzida em todos os TLRs analisados e expressão elevada dos genes Reg1 e Reg2 em ilhotas pancreáticas. Além disso, foi possível verificar o contraste de expressão de Reg1 e Reg2 frente aos TLRs no período pré-diabético, em que Reg1 e Reg2 apresentaram expressão gênica reduzida, enquanto os TLRs apresentaram expressão elevada. Em conjunto, estes dados sugerem possível associação entre a ativação dos TLRs e a redução da expressão dos genes de regeneração Reg1 e Reg2 na fase de indução da insulite, tornando-se necessário avaliar se os fatores inflamatórios afetam o balanço dos sistemas biológicos com consequente controle da capacidade regenerativa celular ou se a falha no sistema biológico age como fator primário de indução ao dano tecidual.

ABSTRACT

Employing the lineage of NOD mice (non-obese diabetic) which presents spontaneous development of diabetes mellitus type 1 (T1D) and the lineage NOD.Scid as a control, gene expression of regenerating genes Reg1 and Reg2 and their relation with expression of Toll-Like Receptors (TLRs) was performed, in addition to oxidative stress analysis in pancreatic islets. Animals were assessed during the T1D development at 2, 8 and 24 weeks-old and also in diabetic animals and NOD.Scid control. The insulinitis and the oxidative stress process increased progressively with age, beyond the drastically decreased of islets number in diabetic animals. Analysis of oxidative stress in islets has been shown progressive with age and may be related to the development of diabetes. Reg1 and Reg2 genes were high expressed in islets of NOD mice aged 2 weeks-old, diabetic animals and NOD.Scid control. Receptors TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 were expressed in all animals, however mice aged 8 and 24 weeks-old showed a significant increase expression, being TLR2 an exception where there was low expression in mice aged 24 weeks-old which suggests that their expression should be related to the induction phase of insulinitis. Diabetic mice showed reduced expression in all TLRs analyzed and high expression of Reg1 and Reg2 in pancreatic islets. Furthermore, Reg1 and Reg2 showed a contrast of expression when related to TLRs at pre-diabetic stage, with low expression of Reg1 and Reg2 and high expression of TLRs. Taken together, these results suggest a possible correlation between the activation of TLRs and the reduced expression of regenerating genes Reg1 and Reg2 in the induction phase of insulinitis. Thus, studies are needed to elucidate whether inflammatory factors affect the balance of biological systems with consequent regenerative cell control capacity or if the failure in the biological system acts as a primary factor inducing tissue damage.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Diabetes Mellitus

O Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou ambas. A hiperglicemia crônica do diabetes é associada a danos ao longo do tempo, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração, e vasos sanguíneos [1] .

Entre os vários tipos de diabetes, o diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) afeta cerca de 10% dos pacientes com diabetes, sendo caracterizado pela destruição de células β produtoras de insulina no pâncreas. A etiologia autoimune é confirmada pela presença de autoanticorpos circulantes específicos contra antígenos de célula β pancreáticas. Estes autoanticorpos são detectados em 85-90% dos indivíduos com DM-1 ao diagnóstico [2-4]. As manifestações clínicas do distúrbio metabólico surgem quando cerca de 80-90% das células beta são destruídas. Este processo destrutivo leva à falta do hormônio insulina, tornando necessário o constante monitoramento de glicose no sangue, além da administração de insulina diversas vezes ao dia. Se não tratados, os distúrbios metabólicos podem levar a cetose, coma e morte [5-7].

Estudos epidemiológicos envolvendo crianças mostraram que a incidência do DM-1 está crescendo. Com o início da doença tendendo para idades mais jovens, provavelmente os fatores ambientais atuam expressivamente debilitando a tolerância imunológica no organismo [8, 9]. No estudo de Patterson e colaboradores (2009), foi previsto que entre 2015 e 2020 os casos de DM-1 irão dobrar entre crianças europeias menores que cinco anos de idade [10].

Para a compreensão da fisiopatologia do DM-1, os modelos animais são ferramentas muito úteis, desde os que necessitam de indução química como a streptozotocina com seu efeito citotóxico direto em células β pancreáticas, até animais que possuem desenvolvimento espontâneo para a doença. Desde o seu estabelecimento, experimentos com a linhagem de camundongos NOD (*non obese diabetic*) com diabetes de desenvolvimento espontâneo consolidaram a

importância de linfócitos T na fisiopatologia do DM-1. Entretanto, os eventos que iniciam a doença e os fatores que levam à infiltração celular inflamatória progressiva, em particular de linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺) e linfócitos B, células dendríticas, e macrófagos nas ilhotas pancreáticas ainda não estão completamente elucidados [11].

1.2 Camundongos NOD

A linhagem de camundongos NOD descrita por MAKINO e colaboradores (1980) [12] tem sido o modelo experimental mais utilizado para estudar as características do diabetes autoimune experimental, pelo fato de assemelhar-se clinicamente ao DM-1 observado em humanos. Esta linhagem foi inicialmente desenvolvida no Japão e desde então é utilizada em diversos centros de pesquisa do mundo para compreensão dos complexos processos encontrados em doenças auto-imunes.

No Brasil, a linhagem foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas por Pavin & Zollner (1994) [13] a partir de colônias matrizes provenientes do laboratório INSERM U-25-Necker, Paris, França. A colônia apresenta, em condições livres de patógenos (SPF), prevalência de diabetes espontânea entre 60-90% nas fêmeas e 5-20% nos machos. Fatores ambientais como dieta e exposição a vírus têm sido considerados como causa das diferenças de incidência.

O início do diabetes, nestes camundongos, ocorre tipicamente entre a 12^a e 24^a semanas de vida, sendo mais frequente em fêmeas [12]. Estudos histológicos mostraram que, aproximadamente na 4^a semana de vida são notadas poucas células imunes infiltradas nas ilhotas (inicialmente linfócitos T CD4⁺ e posteriormente linfócitos T CD8⁺) e presença de infiltrados mononucleares ao redor das ilhotas, caracterizando peri-insulite. Estes infiltrados mononucleares progridem e invadem as ilhotas pancreáticas (insulite) durante as semanas

subsequentes [14] . Linfócitos T CD4⁺ são predominantemente observados na fase precoce da infiltração, onde são requeridos para o processo de expansão clonal através da produção de IL-2 e, dessa forma, aumentar a ativação de linfócitos T CD8⁺ [15].

A introdução da mutação de imunodeficiência combinada grave (Scid) no camundongo NOD por Shultz e colaboradores (1995) [16], criou o camundongo NOD.Scid. A nova linhagem NOD.Scid possui menor imunidade residual que a linhagem Scid, devido o camundongo NOD possuir defeito na atividade lítica do sistema complemento, através da deficiência de C5, e por possuir deficiência em macrófagos funcionais [16, 17]. A mutação Scid afeta a diferenciação de células tronco em linfócitos maduros, mas não prejudica a diferenciação mielóide, sendo amplamente utilizado em estudos sobre células tronco hematopoiéticas após transplante de vários tipos de células tronco derivadas de medula óssea, sangue de cordão umbilical ou sangue periférico mobilizado [18-20]. Dessa maneira, no camundongo NOD.Scid ocorre a redução da imunidade pela deficiência de linfócitos B e T funcionais, com conseqüente perda do rearranjo dos genes de imunoglobulinas e receptores de linfócitos T. A deficiência de linfócitos neste modelo experimental impede o processo de insulite e a manifestação do diabetes, tornando possível estudar a diabetogênese pela exclusão da contribuição de células imunes infiltradas nas ilhotas pancreáticas, além de demonstrar a importância deste fenótipo na susceptibilidade ao diabetes.

1.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como um estado de desequilíbrio entre os fatores que geram radicais reativos de oxigênio e fatores que protegem macromoléculas celulares desses reagentes, incluindo antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidases. Os fatores que geram espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorrem como produtos de fisiologia celular comum, assim como de diversas fontes exógenas [21]. Em organismos aeróbios,

reações químicas estão sempre associadas com chances de formação de superóxido, molécula primária de ROS em sistemas biológicos. O superóxido é produzido quando o oxigênio molecular, ao invés do substrato específico, é reduzido pela aquisição de um elétron. A NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato), ao contrário de outras oxidorredutases, é uma fonte enzimática de produção de ROS, enquanto que outras enzimas produzem ROS somente como subproduto ao longo de suas vias específicas de sinalização [22].

No sistema imune, não podemos caracterizar ROS como produto específico de um subtipo celular ou relacioná-los à apenas uma ação, como causar a morte celular de outras células. Ao invés disso, ROS tem papel fisiológico na sinalização intracelular envolvida na regulação do processo de redução (redox), que provavelmente se estende a todo tipo celular do sistema imunológico. Assim, como em qualquer mecanismo de sinalização, a produção excessiva de ROS pode levar ao dano de lipídeos, proteínas, membranas e ácidos nucleicos, além de amplificar respostas inflamatórias [23, 24]. A restrição da produção de ROS a locais subcelulares apropriados, tempos, níveis, espécies moleculares e durações apropriadas permitem que ROS contribuam para a homeostasia e ativação fisiológica celular. Por exemplo, pulsos breves na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na membrana plasmática ou na membrana endossomal medeiam sinalizações em resposta ao encontro de receptores com citocinas, produtos microbiais ou antígenos. Quando a produção de ROS foge destas restrições ou quando estão em níveis altos e em contínua produção de radicais hidroxilas, por exemplo, as macromoléculas sofrem danos (estresse oxidativo). O dano mediado por ROS pode frequentemente ser revertido por reparo, reposição, degradação ou sequestro das macromoléculas danificadas. Entretanto, o dano que excede a capacidade da célula a estas respostas pode levar à morte celular [25].

O estresse oxidativo e o dano oxidativo aos tecidos são pontos terminais comuns de doenças crônicas como aterosclerose, diabetes e artrite reumatoide. Porém, não se sabe se o estresse oxidativo possui um papel primário nas

complicações da patogênese do diabetes ou se é um indicador secundário de estágio final de dano tecidual [26].

1.4 Regeneração de células β pancreáticas

Regeneração é a capacidade de um órgão repor massa tecidual após remoção parcial ou lesão. Apesar de alguns órgãos demonstrarem crescimento após a lesão, muitos sofrem alterações hipertróficas sem aumento significativo no número de células. Na maioria dos vertebrados, a regeneração é limitada sendo observado algum grau de regeneração na espécie humana. A origem de células progenitoras necessárias para o processo regenerativo varia entre os sistemas de renovação e entre as espécies. A regeneração da função no pâncreas endócrino tem sido documentada em pancreatectomia parcial, ligação ductal e em modelos experimentais [27].

As células β pancreáticas são diferenciadas e especializadas e com funções biológicas complexas. Sua função mais notável é a produção de insulina, hormônio responsável pelo controle da glicemia, que é secretado continuamente em resposta às mudanças na concentração de glicose no meio extracelular. A secreção de insulina por células β também é modificada por uma variedade de nutrientes, hormônios e sinais neuronais na manutenção da homeostasia glicêmica [28]. Na manifestação do diabetes, a homeostasia glicêmica é altamente prejudicada, podendo ser retomada por meio da administração de insulina. Apesar disso, em muitos casos o tratamento apenas com insulina não é suficiente. Assim sendo, diversas pesquisas sobre regeneração de células β e a diferenciação de outros tipos celulares em células produtoras de insulina tem sido intensamente estudadas nas últimas décadas.

O entendimento dos mecanismos de desenvolvimento e reparo das células β é crucial para o estabelecimento de estratégias no tratamento de células produtoras de insulina, no diabetes. Em adultos, a massa de células β é determinada pelo número de células progenitoras embrionárias num balanço dinâmico entre regeneração, neogênese e apoptose [29, 30]. O número de células

β precursoras é estabelecido precocemente na vida embrionária e em circunstâncias de crescimento normal não há compensação pela perda por outras células [30]. Estes aspectos sugerem que o estabelecimento final da massa de células β é processo instrutivo dependente do número de precursores celulares. Contudo, fatores extrínsecos podem afetar o crescimento e diferenciação da célula β durante a gestação e crescimento na obesidade, ambos os conteúdos de insulina na célula β e o número de novas células aumentam. Na presença de insulite ocorre aumento da formação de células β em murinos [31] sugerindo aumento compensatório na massa deste tipo celular induzida por fatores extrínsecos.

As Proteínas dos genes Reg (*Regenerating gene*) constituem uma família conservada de 7 membros (Reg1, Reg2, Reg3 α , Reg3 β , Reg3 δ , Reg3 γ , e Reg4) que são normalmente expressos em tecido acinar pancreático. Sua descoberta proveio da busca por fatores envolvidos na regeneração de ilhotas pancreáticas. Em ratos, a administração de inibidores de poli(ADP-ribose) sintetase/polimerase (PARP) como nicotinamida, após 90% de pancreatectomia, causou aumento drástico de regeneração/expansão em ilhotas e foi sugerido que isto ocorreu devido a novos fatores de crescimento [32]. Em 1988, Terazono e colaboradores [33] isolaram o cDNA dessas ilhotas em regeneração e o nomeou Reg, o gene associado à regeneração, agora conhecido como Reg1. Em embriões humanos, a expressão de Reg1 no pâncreas ocorre na fase inicial e coincide com a expansão de ilhotas [34, 35]. Camundongos também manifestam na fase inicial a expressão dos genes Reg1 e Reg2, na mesma fase em que os genes de insulina I e II são ativados consecutivamente [36].

Alguns estudos sugerem que Reg1 promove a progressão do ciclo e proliferação celular em ilhotas pancreáticas [37-39]. Adicionalmente, a falta do gene Reg1 (Reg1^{-/-}) resultou em declínio significativo de síntese de DNA em ilhotas isoladas e diminuição da hiperplasia de célula β em resposta à obesidade, confirmando seu papel no crescimento de ilhotas pancreáticas [40]. A expressão pancreática de Reg2 foi encontrada em camundongos NOD fêmeas, que desenvolvem diabetes, enquanto que camundongos NOD machos possuem nível

baixo de mRNA, fato similar ao encontrado na linhagem controle [41, 42]. Além disso, os camundongos NOD diabético e C57BL/6 tratado com streptozotocina expressaram Reg2 de forma aumentada em ilhotas pancreáticas após tratamento com adjuvante completo de Freund (CFA); o aumento foi correlacionado com a redução da insulite [43].

Sanchez e colaboradores (2000) [42] demonstraram que a expressão gênica e protéica de Reg permanece restrita ao tecido exócrino, ambas em camundongos tratados com ciclofosfamida, que representa estágio pré-diabético, e em fêmeas NOD diabéticas. Outros estudos [44, 45] sugerem que os membros da família Reg, tais como Reg2, podem ser alvos úteis para terapias regenerativas de células β para reverter o diabetes mellitus tipo 1.

1.5 Receptores *Toll-Like* (TLRs)

Em 1996, o receptor Toll foi originalmente identificado em *Drosophila* como um receptor essencial para o estabelecimento do padrão dorso-ventral durante o desenvolvimento embrionário da mosca [46]. Subsequentemente, homólogos mamíferos do receptor Toll foram identificados em células do sistema imune e designados como receptores *Toll-like* (TLRs) [47].

Os TLRs são os receptores melhor caracterizados no reconhecimento de padrões (PRRs) e estão distribuídos na superfície celular ou em compartimentos intracelulares. Estes receptores possuem capacidade de reconhecer estruturas moleculares que são amplamente compartilhadas por patógenos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O reconhecimento de PAMPs por PRRs leva à cascata de sinalização intracelular que culmina na indução de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, interferon tipo I ($\text{IFN}\alpha$ ou β) e maturação de células dendríticas (DC), levando à ativação da imunidade adaptativa pela família de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF κ B), a proteína de ativação 1 (AP-1), o fator nuclear interleucina 6 (NF-IL6), o

fator regulatório de interferon (IRF) e o transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) [48].

Além do reconhecimento de PAMPs, diversos ligantes endógenos têm sido identificados, incluindo diferentes proteínas intracelulares [49-52], ácido nucleicos [53, 54] e componentes da matriz extracelular [55-57]. As proteínas *Heat Shock* (HSPs) têm sido associadas como ligantes devido à possibilidade de serem liberadas em locais de ocorrência de danos celulares, em células necróticas ou apoptóticas, sob condições de estresse [58] ou por ser enviada em direção à superfície celular por endolisossomos [59]. Apesar disso, sua função é a de ligar proteínas parcialmente dobradas a fim de evitar sua agregação ou o enrolamento incorreto. Quando essas proteínas acabam por ser liberadas no meio extracelular, podem se difundir entre células vizinhas e ativar receptores da imunidade inata. Testes *in vitro* mostraram que HSPs recombinantes de mamíferos podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF α , IL-1, IL-6 e IL-12 por monócitos, macrófagos e células dendríticas [58]. Por outro lado, também foi sugerido que as HSPs aumentaram a capacidade de ligantes como o LPS em estimular a produção de citocinas e a maturação de células dendríticas [60].

Originalmente, a expressão dos TLRs foi descrita em células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos, mas está se tornando evidente que os TLR's são amplamente expressos em todo o corpo em células tão diversas como hepatócitos, células musculares lisas vasculares e neurônios. Estes receptores possuem muitas similaridades estruturais, mas diferem um do outro na especificidade a ligantes e na expressão de padrões, com variabilidade nas vias de sinalização que eles ativam [61].

Por meio de vias de sinalização, os TLRs representam o mecanismo de resposta imune inata, que pode ser encontrada em insetos, plantas e mamíferos [62]. Entretanto, evidências sugerem que os TLRs possuem papel importante no desenvolvimento de doenças auto-imunes. Experimentos demonstraram que a ativação inapropriada destes receptores desencadeia o início de artrite reumatoide, esclerose múltipla (encefalomielite auto-imune experimental em

camundongos), miocardite, DM-1, lúpus eritematoso sistêmico e aterosclerose [63-68]. O desenvolvimento de DM-1 tem sido associado a agentes infecciosos, embora uma ligação clara não tenha sido estabelecida. Infecções também podem atuar como antagonistas do desenvolvimento de DM-1, sugerindo que a ativação dos TLRs é apenas um de muitos fatores que modulam a indução do diabetes auto-imune.

Estruturalmente, os TLRs são proteínas transmembranas do tipo 1, com repetições ricas em leucina (LRR – *leucine rich repeats*) no domínio extracelular e um domínio de sinalização intracelular denominado receptor Toll/IL-1 (TIR), assim chamado por haver alta similaridade com a família do receptor IL-1 [69]. Espécies mamíferas possuem de 10 a 15 TLRs, aproximadamente, sendo descritos 10 e 13 receptores em camundongos e humanos, respectivamente [48, 70]. Estes receptores podem estar presentes em membranas celulares ou associado com vesículas intracelulares (Figura 1). Os TLRs localizados na superfície celular são especializados principalmente no reconhecimento de produtos bacterianos que não são produzidos pelo hospedeiro [71]. Dentre os TLRs de membrana, podemos citar o TLR4, que reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, enquanto que o TLR5 reconhece a flagelina, o maior componente dos flagelos bacterianos. Outro receptor, o TLR2, reconhece peptidoglicanos, lipopeptídeos e lipoproteínas de bactérias Gram-positivas, sendo que ao formar heterodímeros com TLR1 e TLR6 podem reconhecer triacil e diacil-lipopeptídeos, respectivamente [72]. O TLR11, presente apenas em camundongos, reconhece *Escherichia coli* uropatogênica [73]. No caso dos TLRs intracelulares, estes receptores reconhecem ácidos nucleicos, sendo que o TLR3 reconhece o RNA de dupla fita, TLR7 e TLR8 reconhecem o RNA de fita simples e o TLR9 reconhece o DNA bacteriano rico em CpG. Além disso, diferentes componentes sintéticos estruturalmente relacionados a ácidos nucleicos também podem ser detectados pelo TLR7. Em humanos, TLR7 e TLR9 são predominantemente expressos em DC plasmocitóides (pDCs) e em células B, enquanto que em camundongos se expressam apenas DCs mielóides [69, 71].

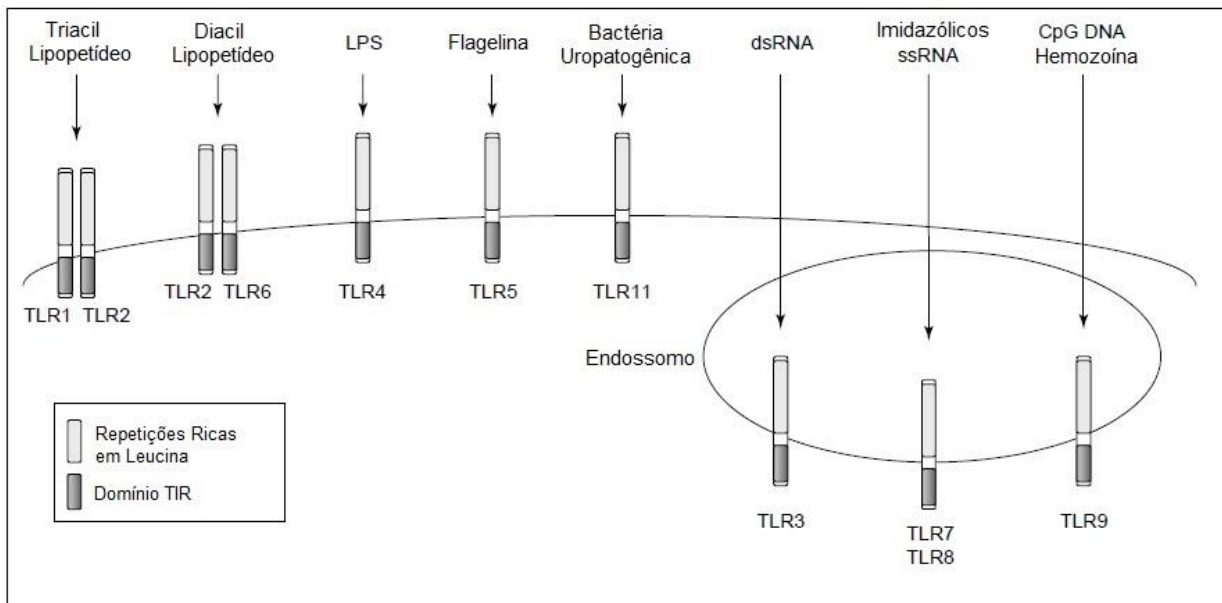


Figura 1. Estrutura e ligantes dos Receptores *Toll-Like*. TLR2 em colaboração com TLR1 ou TLR6, discrimina entre a estrutura molecular de triacil ou diacil-lipopetídeos, respectivamente. TLR4 reconhece LPS bacteriano. TLR5 reconhece a flagelina bacteriana. TLR11 reconhece produtos bacterianos uropatogênicos. TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 residem em compartimentos endossomais e reconhecem ácidos nucleicos; TLR3 reconhece dupla fita de RNA (dsRNA) viral enquanto que TLR7 e TLR8 reconhecem fita simples de RNA (ssRNA) viral. TLR9 reconhece CpG DNA bacteriano e viral. TLR9 também reconhece não-ácidos nucleicos, como a hemozoína (Adaptado de Kawai & Akira, 2005)

1.5.1 TLR2

A expressão de TLR2, ativação e sinalização estão significativamente aumentadas em pacientes com DM-1 e camundongos NOD [74]. O TLR2 está envolvido na resposta a uma variedade de componentes bacterianos que incluem peptideoglicanos, lipoproteínas/lipopeptídeos, glicosil-fosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi*, e zymosan, um componente das paredes celulares de leveduras [75-78].

A dimerização é o principal evento na ativação funcional dos TLRs. TLR2 requer heterodimerização com TLR1 ou TLR6 para ser acionado, resultando na produção de citocinas [79], porém os detalhes destas estruturas ainda não são conhecidos. Sob hiperglicemia, a associação de TLR2/TLR6 resulta na secreção de citocinas em monócitos humanos, além de resultar no recrutamento da proteína

adaptadora Myd88, ativação da cascata de sinalização através da fosforilação de IRAK-1, ativação de TRIF, NF-κB, e da alta regulação na expressão de citocinas pró-inflamatórias [80].

1.5.2 TLR1 e TLR6

Co-transfecção de TLR1 e TLR6 em células HeLa confere capacidade de resposta aos fatores solúveis liberados de *Neisseria meningitidis* [81]. Análises em camundongos TLR1-deficientes têm mostrado a importância do TLR1 no reconhecimento de triacil lipopetídeos [82]. O TLR1 possui alta homologia com TLR6. Portanto, o TLR6 pode em alguns casos compensar a deficiência de TLR1 no reconhecimento de triacil lipopetídeos. O envolvimento do TLR1 no reconhecimento de lipoproteínas na membrana externa de *B. burgdorferi* também foi apresentado [83].

O TLR2 tem sido associado funcionalmente a outros TLRs, como o TLR1 e TLR6. Tal associação permite o reconhecimento de uma ampla variedade de antígenos microbianos, já que a forma molecular e a conformação supramolecular dos ligantes são importantes para a atividade biológica e para o reconhecimento pelos TLRs. Entretanto, é desconhecido se a dimerização do TLR2 com outros TLRs ocorrem constitutivamente ou se é induzido em resposta à estimulação por ligante. Também é desconhecido se o TLR2 forma um grande complexo contendo TLR1, TLR6, e outros TLRs [69]. O lipopetídeo bacteriano (LP) tem sido descrito como o responsável pela sinalização dependente de TLR6 [84], apesar de sua conformação ser pobremente entendida.

1.5.3 TLR4

O TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS), um componente integral de membranas externas de bactérias gram-negativas e o agente causador de choque anafilático [85, 86]. O reconhecimento do LPS requer outras moléculas em adição

ao TLR4. Uma proteína adaptadora presente no soro liga-se ao LPS e ocorre a formação de um complexo que é subsequentemente reconhecido por CD14, uma molécula expressa preferencialmente em monócitos/macrófagos e neutrófilos. A estimulação pelo LPS é seguida pela aproximação entre CD14 e TLR4, sugerindo que CD14 e TLR4 podem interagir na sinalização do LPS [87, 88]. A molécula MD-2 também foi identificada por estar em associação com a porção extracelular do TLR4, aumentando a resposta ao LPS [89].

Assim, o TLR4 está presumivelmente envolvido em diferentes aspectos da resposta inflamatória pelo reconhecimento de ligantes endógenos produzidos durante a inflamação, mesmo na falta de infecção. Entretanto, foi observado que todos esses ligantes endógenos do TLR4 ativam as células imunes apenas em concentrações muito altas, na qual está evidente o contraste às concentrações requeridas pelo LPS. Portanto, resta a possibilidade de que tais ligantes endógenos possam estar contaminados com um verdadeiro ligante do TLR4 como LPS [69]. Uma questão intrigante é se o TLR4 reconhece esses ligantes diretamente ou não. O reconhecimento espécie-específico de diferentes ligantes prevê um tipo de evidência genética para interação direta. Por exemplo, células de rato, mas não de humanos, reconhecem o Taxol (substância anticancerígena), e este reconhecimento espécie-específico é conferido por MD-2 (37-40).

1.5.4 TLR5

O TLR5 reconhece a flagelina em sua forma solúvel/monomérica, um monômero de 55kDa do flagelo bacteriano. O flagelo é um apêndice polimérico em forma de bastão que se estende da membrana externa de bactérias gram-negativas com a função de impulsionar o organismo através do ambiente aquoso [90]. A flagelina é também um potente fator pró-inflamatório. In vivo, a ligação TLR5-flagelina tem sido associada ao desenvolvimento do colapso cardiovascular [91, 92], inflamação pulmonar aguda [92] e doenças inflamatórias intestinais [93] em camundongos.

Em resumo, as informações obtidas até o momento empregando modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1, sugerem que a manifestação da doença pode estar ligada a múltiplos fatores, como os descritos anteriormente, ou até mesmo estarem mais interligados ou dependentes do que imaginamos. Os estudos de importantes representantes do sistema imunológico, como os receptores *Toll-Like*, e da regulação de eventos que podem se manifestar tanto em benefício quanto prejudicialmente aos componentes celulares, são cruciais para a assimilação e o desenvolvimento de estratégias e terapias futuras. Dessa forma, acreditamos que a expressão dos Receptores *Toll-Like* em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD ocasiona o aumento do processo inflamatório, participando ativamente da destruição das ilhotas. Além disso, acreditamos também que o estresse oxidativo influencia e acompanha gradativamente o processo de infiltração nas ilhotas, conduzindo à lesão celular e conseqüentemente, à manifestação do diabetes.

Hipótese de trabalho: O estresse oxidativo que ocorre na insulite é acompanhada de aumento de Receptores Toll Like e modulação na expressão dos genes Reg1 e Reg2.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Estudar a expressão temporal dos fatores de regeneração Reg1, Reg2 e dos Receptores *Toll-like*, além de avaliar o estresse oxidativo no desenvolvimento do diabetes em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD.

2.2 Objetivos Específicos

Estabelecer o perfil comparativo em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD durante o desenvolvimento do diabetes e em animais diabéticos com referência a:

1. Classificação dos graus de insulite e do estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas.
2. Expressão gênica dos Receptores *Toll-Like* (TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) em ilhotas pancreáticas.
3. Expressão gênica de fatores de regeneração Reg1 e Reg2 em ilhotas pancreáticas.
4. Expressão gênica de Reg1 e Reg2 em relação à expressão dos Receptores *Toll-Like* no tempo e manifestação do diabetes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

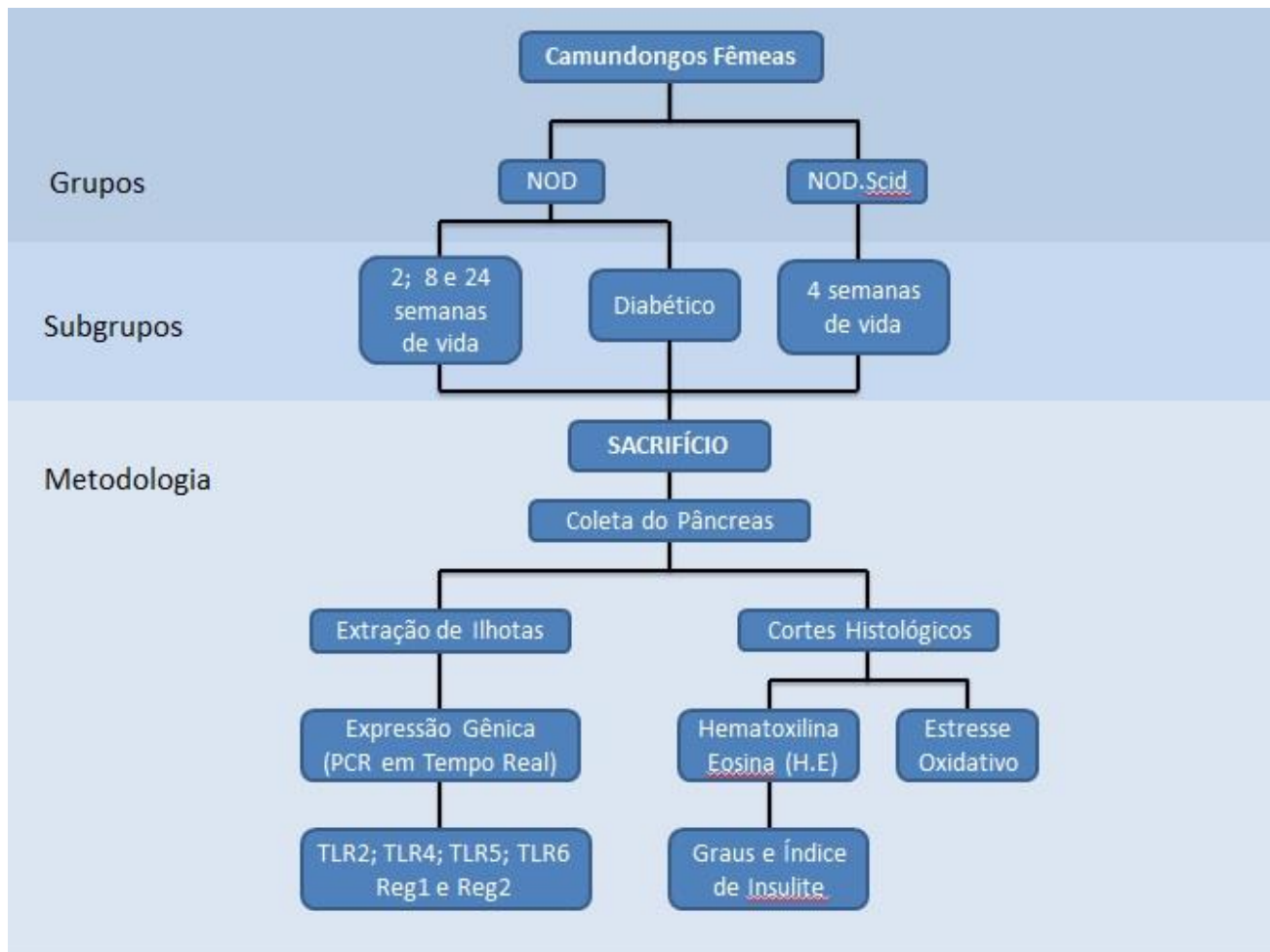


Figura 2. Fluxograma das diferentes etapas do desenho experimental.

3.1 Animais

No presente estudo foram utilizados 40 camundongos NOD fêmeas da linhagem NOD-uni (*Non-Obese Diabetic*) e 10 camundongos NOD.scid adquiridos do CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp) eram mantidos em condições SPF (sala e armários/estantes com sistema SPF individual) com água e ração estéreis *ad libitum*, no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental. Os grupos experimentais eram estabelecidos como descrito a seguir:

Grupo NOD: 40 camundongos fêmeas eram subdivididos em 10 animais/subgrupo, sendo cada subgrupo definido pela idade do animal: 2, 8 e 24 semanas de vida.

Grupo NOD.scid: 10 camundongos fêmeas eram utilizados para o subgrupo de 4 semanas de vida.

O camundongo NOD.scid era sacrificado apenas na 4^a semana de vida, como controle NOD imunodeficiente celular (ausência de insulite) pelo fato nosso laboratório não possuir sistema *germ free* de armazenamento. Os procedimentos envolvendo animais e seus cuidados eram conduzidos de acordo com as diretrizes e recomendações estabelecidas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-Unicamp). Aprovado com protocolo CEEA 1943-1.

3.2 Diagnóstico do Diabetes e Sacrifício dos Animais

A ocorrência do DM-1 era monitorada no grupo NOD a partir da 10^a semana de vida. As glicemias eram monitoradas semanalmente através de glicosímetro Prestige LX® (Home Diagnostic, EUA) retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal. Os animais eram considerados diabéticos após confirmação de hiperglicemia, medidas por meio de glicosímetro com dois valores glicêmicos semanais consecutivos ≥ 250 mg/dL.

Os animais que apresentavam diabetes ou que estavam na idade referente ao seu subgrupo eram anestesiados com cloridrato de xilazina (100-200mg/kg de peso) e cloridrato de ketamina (5-16mg/kg de peso) e submetidos à coleta de sangue periférico por meio de punção cardíaca. Após este procedimento, realizava-se a remoção do pâncreas, sendo o mesmo depositado em cápsulas contendo meio de inclusão O.C.T (Tissue Tek® Miles – EUA) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido ou submetido à digestão com colagenase para extração de ilhotas. As peças incluídas em OCT eram conservadas em bio-freezer a $- 80^{\circ}\text{C}$ até processamento histológico. Após este procedimento os pâncreas eram submetidos à criocortes para estudo morfológico e análise de estresse oxidativo, empregando-se cortes obtidos em criostato (Leica, CM 1850, Alemanha).

3.3 Análise Morfológica

A avaliação histológica dos pâncreas tinha como objetivo os aspectos da morfologia das ilhotas pancreáticas e de seu eventual grau de insulite. Após o posicionamento do pâncreas no suporte do criostato de maneira a se obter a maior área possível de corte, era coletada uma série de 15 cortes consecutivos, com 5µm de espessura, depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (γ -Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane, Sigma) segundo procedimento estabelecido em nosso laboratório [94, 95]. Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas era desbastado 150µm e, a seguir, outra série de 15 cortes era igualmente processada. Esse procedimento era realizado até obter-se 3 cortes por lâmina, em um total de 30 lâminas.

As lâminas de nº 1, 15, 16 e 30 eram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina o que permite detectar a presença de infiltrado inflamatório em toda extensão do órgão. As ilhotas eram então classificadas segundo o grau de infiltrado celular (insulite) apresentado, conforme Leiter [96] seguindo a fórmula abaixo:

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

Em que: I=Índice; Números 0, 1, 2, 3 e 4 = diferentes graus de insulite; N_0 N_1 N_2 N_3 N_4 = número total de ilhotas com respectivos graus de lesão.

3.4 Técnica do Estresse Oxidativo

A técnica de estresse oxidativo tem sido utilizada para detectar a oxidação proteica em diversos tipos de tecidos de uma variedade de órgãos e espécies animais. O método envolve derivatização química de grupos proteicos carbonila com 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH). A reação química resulta em proteínas sendo covalentemente ligadas ao DNP em suas ligações carbonila. As proteínas de DNP derivatizadas são então detectadas usando um anticorpo que se liga

especificamente à porção de DNP. Subsequentemente há incubação com anticorpo secundário conjugado com biotina, estreptoavidina conjugada com Peroxidase de Armorácia (HRP) e desenvolvimento utilizando coloração 3,3' diaminobenzidina (DAB) que permite a detecção imuno-histoquímica da proteína de oxidação. Lâminas com seções de tecidos pancreáticos congelados de cada grupo eram fixadas em methacarn por 15 minutos e em seguida lavadas 3 vezes por 5 minutos em água deionizada. Os cortes eram incubados em solução bloqueio (H₂O₂ - água oxigenada 3%) durante 10 minutos. Após esta etapa, a reação de estresse oxidativo era realizada segundo instruções do fabricante (*"OxyIHC™ Oxidative Stress Detection Kit"* Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os cortes, assim preparados, eram observados e suas imagens captadas por microscópio Nikon Eclipse 80i, empregando programa computacional NIS-ELEMENTS AR, Nikon.

3.5 Extração de Ilhotas Pancreáticas

As ilhotas eram isoladas seguindo-se a técnica descrita por Li e colaboradores (2009) [97] com adaptações em nosso laboratório visando melhorar o rendimento, conforme descrição a seguir.

Após anestesia, os animais tiveram suas cavidades abdominais abertas e os pâncreas localizados. A região de ligação entre o ducto pancreático e o duodeno era isolada com auxílio de duas pinças de Kelly, posicionadas anterior e posterior à papila duodenal. Na outra extremidade, o ducto era posicionado com auxílio de pinça fina. Era injetado, por meio de seringa de 1 mL, colagenase V (2,5 mg/mL - Sigma) em solução de Hanks contendo 2,8 mM de glicose até intumescimento do pâncreas. A seguir, o órgão era removido e transferido para um frasco de vidro onde sofria fragmentação suave com o auxílio de tesoura cirúrgica, sendo posteriormente encubado em banho térmico a 37°C durante 17 minutos para animais de até 9 semanas de vida, 20 minutos para animais de 10 a 16 semanas de vida e 22 minutos para animais de 17 a 24 semanas de vida.

Neste período, sob banho térmico, o frasco era agitado manualmente 3 vezes para auxiliar na digestão do órgão. Em seguida, o conteúdo era transferido para um becker de vidro de 50mL, sendo adicionada solução de Hanks até completar volume de 40 mL. A preparação era homogeneizada com auxílio de seringa de 20 mL. Após intervalo de 20 minutos, aspirava-se o sobrenadante vagorosamente por meio de seringa, repetindo-se este procedimento por 3 vezes com a finalidade de separação do tecido adiposo, colagenase e enzimas pancreáticas. O material resultante era corado com Ditizona (Sigma, St Louis, EUA) para a identificação, confirmação e para atestar a viabilidade das ilhotas. Após o banho térmico, todo o procedimento era realizado sob gelo.

O isolamento das ilhotas era realizado manualmente sob lupa, colocando-se 10 mL da suspensão de ilhotas em uma placa de Petri com fundo escuro. As ilhotas eram coletadas por aspiração, com auxílio de ponteira RNase *free* com barreira e as ilhotas identificadas por microscopia óptica em aumento de 100x. Após este procedimento, ilhotas eram transferidas para sistema de extração automatizada de RNA (Exiprep, Bioneer, Coreia).

3.6 Extração de RNA Total (TRNA)

O RNA Total era extraído das ilhotas pancreáticas empregando o método de extração automatizada pelo Sistema ExiPrep16® (Bioneer, Coreia) e reagentes Exiprep 16 Plus, Cell Total RNA Kit (K-3335). O RNA total era estimado por intermédio de leitura em espectrofotômetro Picodrop 2.0 (Picodrop Ltd, Saffron Walden, Inglaterra) e sua integridade verificada por corrida em eletroforese em gel de formaldeído. RNA era considerado de boa qualidade com a relação das leituras 260/280 entre 1.6 e 2.0. Todas as amostras de RNA total eram armazenadas a -80° até o uso.

3.7 Avaliação quantitativa da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em Tempo Real

O perfil de expressão gênica era estabelecido empregando o sistema de PCR em Tempo Real (Exicycler96®, Bioneer, Coreia). O sistema SensiMix No-Rox one-Step (Bioline, EUA) era empregado permitindo que ambos cDNA e PCR em Tempo Real fossem desenvolvidos em uma reação completa a partir do RNA total extraído. Primers específicos que reconheçam TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, REG1, REG2 e ciclofilina A (Fermentas, Thermo, EUA) estão descritos na Tabela 1 (página 40). Os dados eram analisados pelo programa computacional Exicycler3® analyser, Bioneer, Coreia e as condições de reação eram estabelecidas para cada sequência de amplicons por perfil de ciclos. As eficiências eram determinadas pela curva de amplificação considerando-se número de cópias x CT. O *slope* da curva nestas condições era de -0.3, para eficiência de 98 a 100%. As análises das amplificações e suas comparações eram realizadas considerando-se a relação $2^{-\Delta Ct}$.

O Método CT Comparativo usa fórmulas aritméticas para alcançar o resultado para quantificação relativa. É possível eliminar o uso de curvas padrões e usar o Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para quantificação relativa enquanto as eficiências de PCR entre o(s) alvo(s) e o(s) controle(s) endógeno(s) forem relativamente equivalentes [98-100]. Em situações em que os dados experimentais de PCR em tempo real necessitam ser representados como dados de amostras individuais não é necessário utilizar a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Isto é comum durante análises de perfil em que não há controle de tratamento. Nestas condições de experimento, o dado individual normalizado $2^{-\Delta Ct}$ é idêntico ao $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [101].

a. Experimento de Validação para Cálculo de ΔCt .

Para o cálculo ΔCt válido, a amostra no experimento de validação deve expressar ambos os genes alvo e o controle endógeno, com eficiência de amplificação aproximadamente igual. Para determinar se as reações de

amplificação apresentam a mesma eficiência, era realizada curva de amplificação utilizando RNA em diluições seriadas 4x e análise realizadas empregando o software Exicycler™ 96 analysis.

b. Experimento de quantificação relativa de amostras.

As amostras eram amplificadas para o gene alvo e para o controle endógeno em triplicatas, utilizando-se a média como valor de Ct (desvio padrão <1), seguido de cálculo de ΔCt (Ct do controle endógeno – Ct do gene alvo). Para o cálculo da expressão do gene alvo, normalizado pelo controle endógeno (ciclofilina A), era utilizada a fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Para determinação de significância o teste não paramétrico de Mann-Whitney era usado para comparar os valores de ΔCt (Programa Computacional GraphPad Versão 5, La Jolla, CA, EUA).

Primer	Sense	Anti-sense	Produto pb
TLR2	5' TGC CAC CAT TTC CAC G 3'	5' AGG GCG GGT CAG AGT T 3'	184
TLR4	5' TTT ATT CAG AGC CGT TGG 3'	5' CCC ATT CCA GGT AGG TGT 3'	172
TLR5	5' CCC TTG TAG TCA TAA AGT TCC G 3'	5' TTC TGT GCC CAT TCA AAG TC 3'	157
TLR6	5' TTT GTC CCT GGC AAG AGC 3'	5' ATG GCA CCA CTC ACT CTG 3'	108
REG1	5' TCC TAT TGT TAC TAC TTC AC 3'	5' CCA CTC TCC TTA ATC AGA 3'	143
REG2	5' TAT TGT GTA TCG CTG ACT 3'	5' ACT TTA GGC TCT GAA CTT 3'	99
Ciclofilina	5' TCT TTG GAC TCT TTG GAA A 3'	5' GAT GAC ACG ATG GAA CTT 3'	110

Tabela 1: *Primers* utilizados nos procedimentos de PCR-Tempo real com suas sequências descritas acima obedeciam à estratégia sense e anti-sense: TLR2, TLR4, TL5, TLR6, REG1, REG2 e ciclofilina A (gene estrutural). **pb=** pares de bases

3.8 Análise dos Dados

Análise Estatística

Os resultados eram expressos como média \pm desvio padrão e os dados submetidos à análise por teste *t-Student* ou, quando necessário, à análise de variância (ANOVA) entre grupos, seguido pelo teste *Post Hoc* para análise de contrastes. Eram considerados estatisticamente significativos $p < 0.05$ e fornecidos os valores probabilísticos obtidos. O programa computacional Prisma GraphPad versão 5 (La Jolla, CA, USA) era empregado para as análises.

4. RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento do Diabetes e Progressão da Insulite

Do total de animais estudados que foram submetidos à mensuração glicêmica (n=20), 53,3% ficaram diabéticos (Fig. 3, pág 44). Nossa casuística da frequência do diabetes na linhagem é de 60-70% entre a 17^a e 24^a semana de vida.

A análise dos graus de insulite teve como base o estudo histológico do pâncreas endócrino, por meio da coloração convencional de hematoxilina-eosina (H.E). Os pâncreas avaliados apresentavam padrões histológicos compatíveis com o esperado para cortes de congelamento. Além de classificadas, as ilhotas também foram contabilizadas a fim de obter a porcentagem dos graus de insulite. Os resultados da análise histológica mostraram aumento progressivo do infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas e perda progressiva do número total de ilhotas, sendo esta evolução já associada anteriormente ao desenvolvimento do processo inflamatório por Kakutani & Makino (1992) [102]. Na contagem, os animais diabéticos apresentaram média de 85 ± 34 ilhotas por animal e diferiu estatisticamente ($p \leq 0.0079$) dos animais de 2, 8 e 24 semanas de vida, que apresentaram número médio de ilhotas superior, correspondente a 135 ± 20 , 200 ± 68 e 243 ± 62 , respectivamente. Além disso, verificou-se a diminuição do número de ilhotas normais ou com peri-insulite em função do tempo, como também o aumento do número de ilhotas com insulite moderada e avançada (Fig. 4, pág 44). Esses achados histológicos são consistentes com o estágio diabético presente nesses animais, caracterizando a mudança do estágio pré para o diabético, além de confirmar os resultados do trabalho já realizado em nosso laboratório e descrito anteriormente [94].

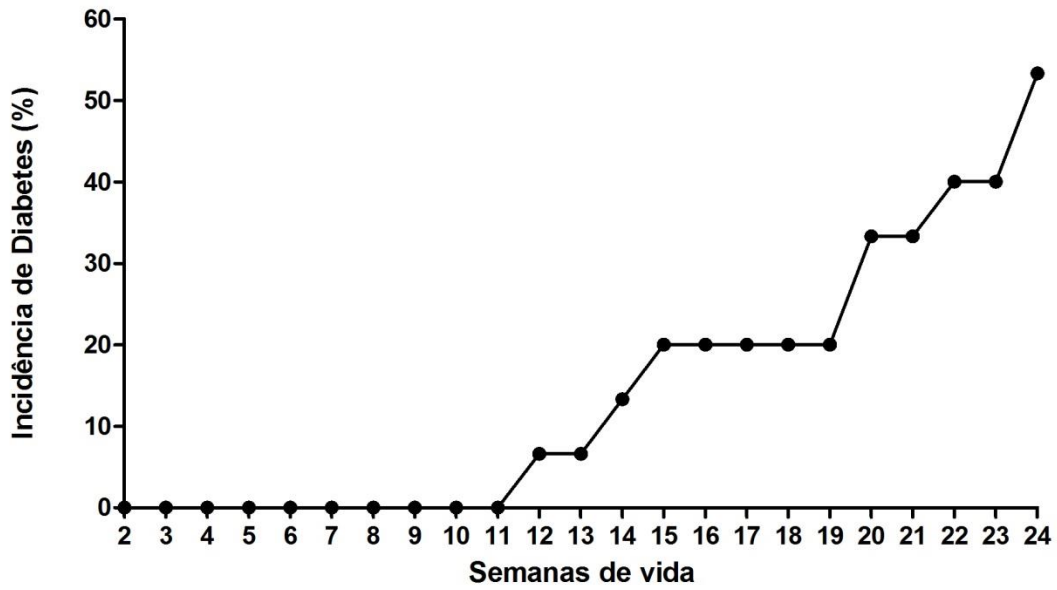


Figura 3: Frequência cumulativa do diabetes em camundongos NOD. Incidência do Diabetes na linhagem: 53,3%.

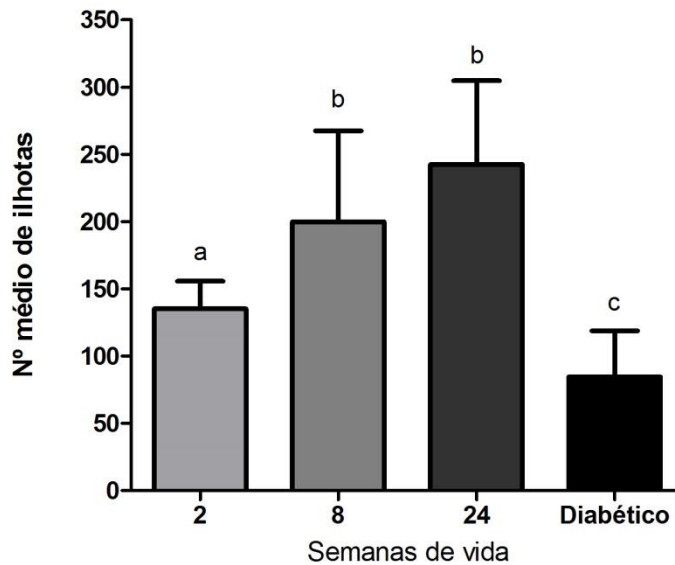


Figura 4. Gráfico representativo do número total de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD. Avaliação pelo teste estatístico de Mann-Whitney com diferença estatística considerada (a/b $p \leq 0.04$), (a/c: $p = 0.0079$) e (b/c $p = 0.004$).

Grau e Índice de Infiltrado nas Ilhotas Pancreáticas

A infiltração das ilhotas pancreáticas por linfócitos T em camundongos NOD fêmeas foi progressivo entre as idades de 2 a 24 semanas de vida para ambos animais pré-diabéticos e diabéticos. Os parâmetros para classificação das ilhotas foram seguidos conforme a Figura 5 (pág 46). A análise morfológica mostrou que animais do grupo NOD apresentavam ilhotas normais e com diferentes graus de insulite, contrastando com o observado nos animais de grupo controle NOD.*scid*, onde a insulite estava ausente (Fig. 6, pág. 47). Nos grupos NOD com 2 e 8 semanas de vida predominaram ilhotas com grau 0 e 1, sendo que os animais de 2 semanas de vida apresentaram ilhotas G0 em cerca de 60% e G1 em torno de 30%, enquanto que os animais de 8 semanas de vida apresentaram G0 e G1 em torno de 25% e 60%, respectivamente. O contrário se observou nos animais de 24 semanas de vida e diabéticos, nos quais foram mais frequentes as ilhotas de grau 3 e 4. Houve equilíbrio de G2 e G3 nestes grupos com porcentagem em torno de 15%, além do equilíbrio de G4 em 40% nos animais de 24 semanas de vida e diabéticos.

A partir da análise do índice de insulite [96] (Fig. 7, pág 47), foi verificado que os grupos 24 semanas e diabéticos apresentaram maior índice de insulite quando comparados aos animais de 2 e 8 semanas de vida ($p=0.004$). Já entre os animais de 2 e 8 semanas de vida houve diminuição do infiltrado de células da resposta imune nas ilhotas pancreáticas de animais de 2 semanas de vida ($p=0.0375$). A Tabela 2 (Anexos, pág. 78) apresenta os valores de média e desvio padrão referentes ao índice de insulite verificado em cada grupo estudado.

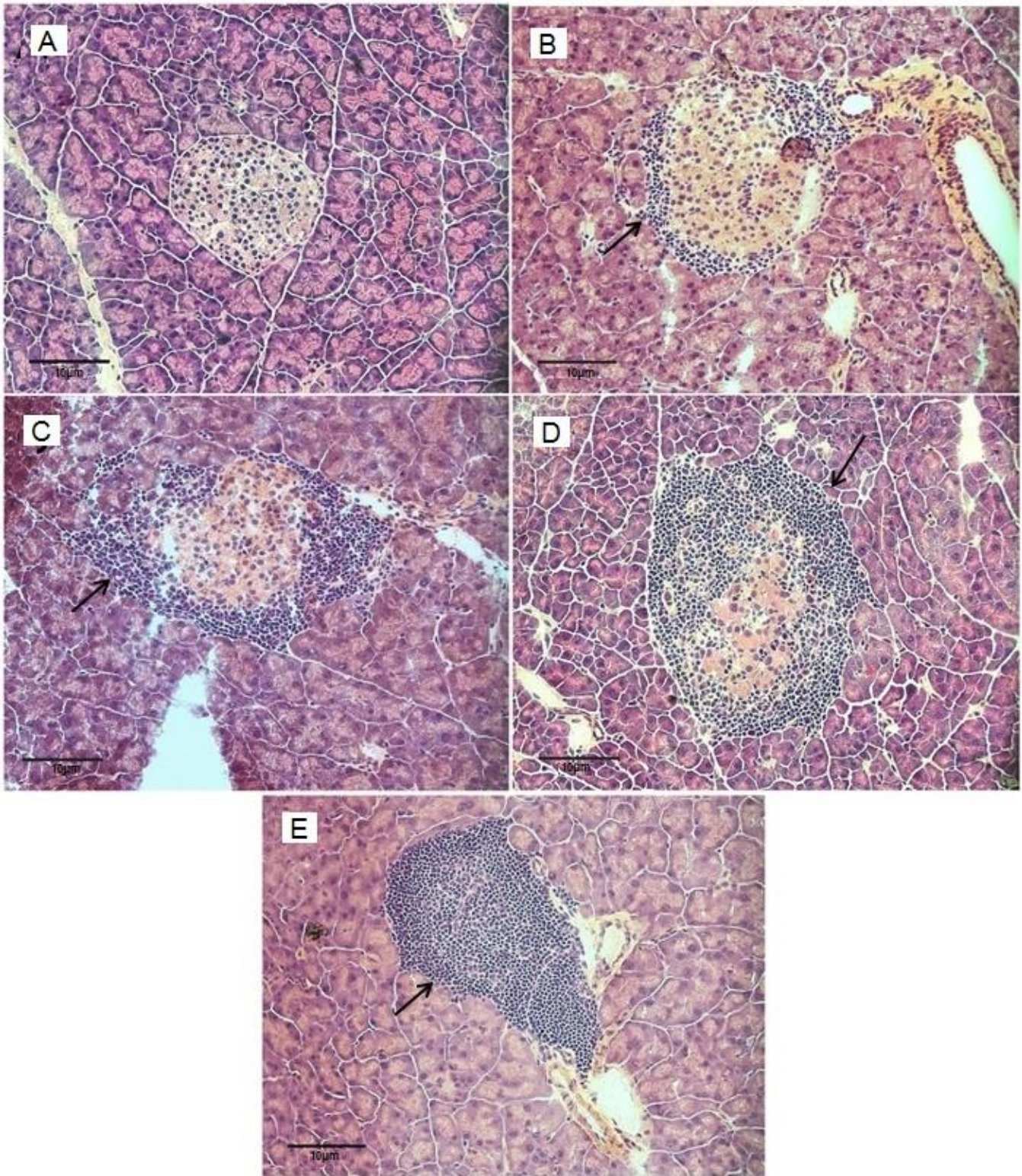


Figura 5. Prancha destacando ilhotas pancreáticas de camundongos NOD demonstrando os diferentes graus de insulite. A) Ilhota íntegra com ausência de infiltrado inflamatório (Grau 0). B) Ilhota com peri-insulite (Grau 1). C) Ilhota com insulite moderada (Grau 2). D) Ilhota com insulite invasiva >80% (Grau 3). E) Ilhota com insulite destrutiva (Grau 4). Aumento de 200x.

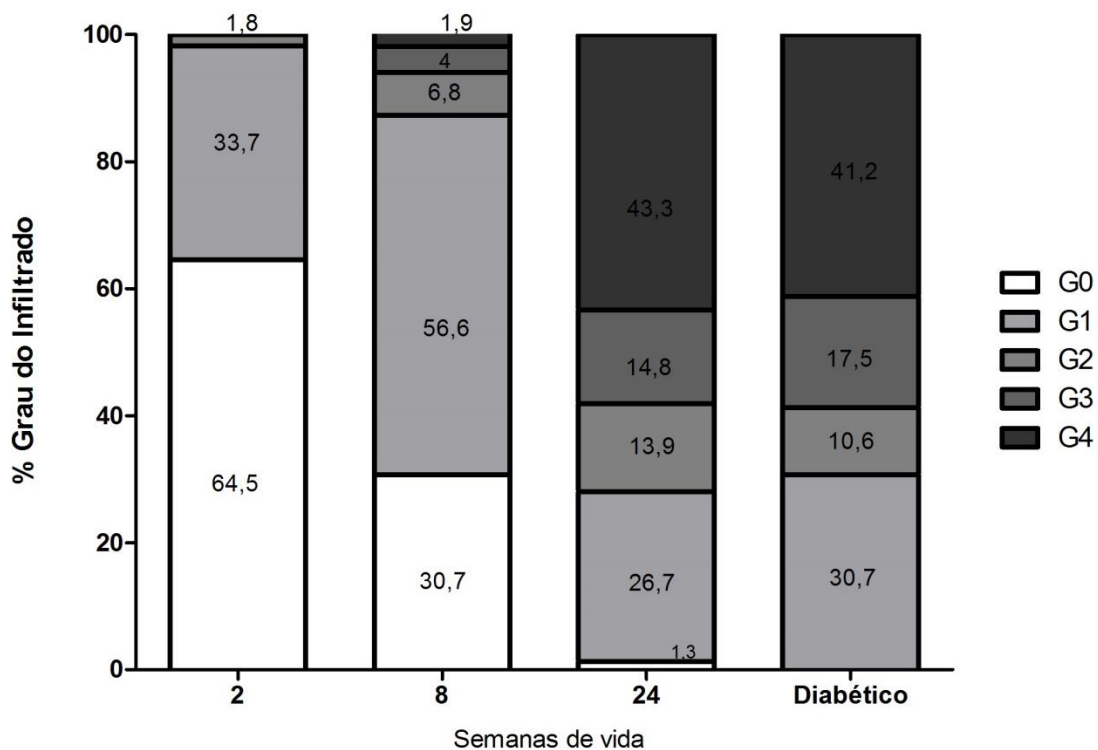


Figura 6. Classificação das ilhotas pancreáticas segundo o Grau de Insulite. A porcentagem de ilhotas estudadas com o grau de lesão está apresentada em cada bloco e coluna representativa do grupo analisado. O grupo NOD.Scid foi omitido devido a ausência de insulite.

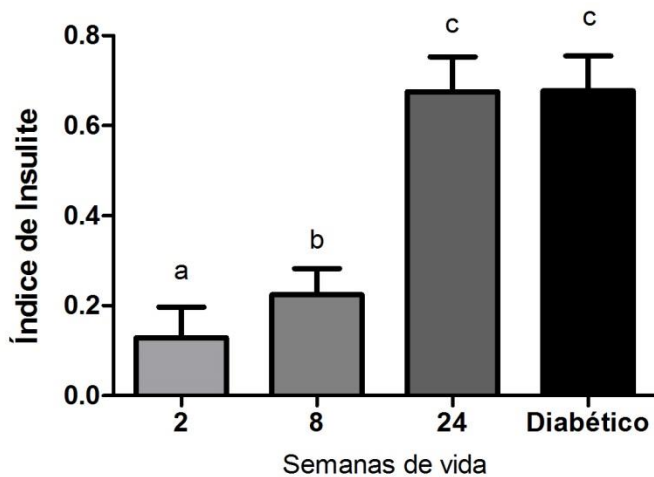


Figura 7. Índice do infiltrado nas ilhotas pancreáticas, conforme Leiter [96] e os respectivos grupos experimentais de camundongos NOD. O grupo NOD.Scid foi omitido devido a ausência de insulite. No eixo vertical está representado o grau de lesão de 0 a 1. Avaliação pelo teste estatístico de Mann-Whitney com diferença estatística considerada (a/b: $p=0.0375$) e (a/c e b/c: $p=0.004$).

4.1 Grau do Estresse Oxidativo nas Ilhotas Pancreáticas

A técnica do estresse oxidativo permitiu a análise da área de ilhotas afetadas pela inflamação. Para a classificação foram utilizados os mesmos parâmetros utilizados na avaliação do infiltrado segundo o grau de insulite, determinando-se a percentagem de área com lesão positivas (marcadas em marrom) após reação histoquímica, como mostram os painéis de A a F na Figura 8, página 49.

A porcentagem da área de células marcadas (Fig. 9, pág. 50) foi utilizada como parâmetro e grau do estresse oxidativo. Desde as primeiras semanas de vida, camundongos NOD apresentam percentual de área de estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas significativamente mais elevados que o controle NOD.Scid ($p < 0.0001$). Em animais de 8 semanas de vida, essa área já alcança cerca de 50% do total, assim como no animal diabético, e assim se mantém até a 24^a semana de vida. Como mostrado na Figura 10 (pág. 50), o controle NOD.Scid foi o único a apresentar ilhotas sem estresse oxidativo (G0), somando 25% do total de ilhotas analisadas, porém também foi verificado a presença de ilhotas com G1 (75%), as quais prevaleceram na análise de animais com 2 semanas de vida (100%). Os animais de 8 semanas de vida apresentaram ilhotas com G1 (17%), G2 (75%) e G4 (8%). Curiosamente, a partir deste grupo houve maior porcentagem de G2, que diminuiu gradualmente, sendo de 72% em 24 semanas e 48% em diabéticos. Os animais de 24 semanas de vida apresentaram, além das ilhotas G2, ilhotas com G1 em 20% e G4 em 8%. Já nos animais diabéticos, conforme diminuiu a porcentagem de G2, houve aumento das porcentagens de G1 (26%) e de G4 (26%), indicando possível relação do dano causado pelo estresse oxidativo ao desenvolvimento do diabetes.

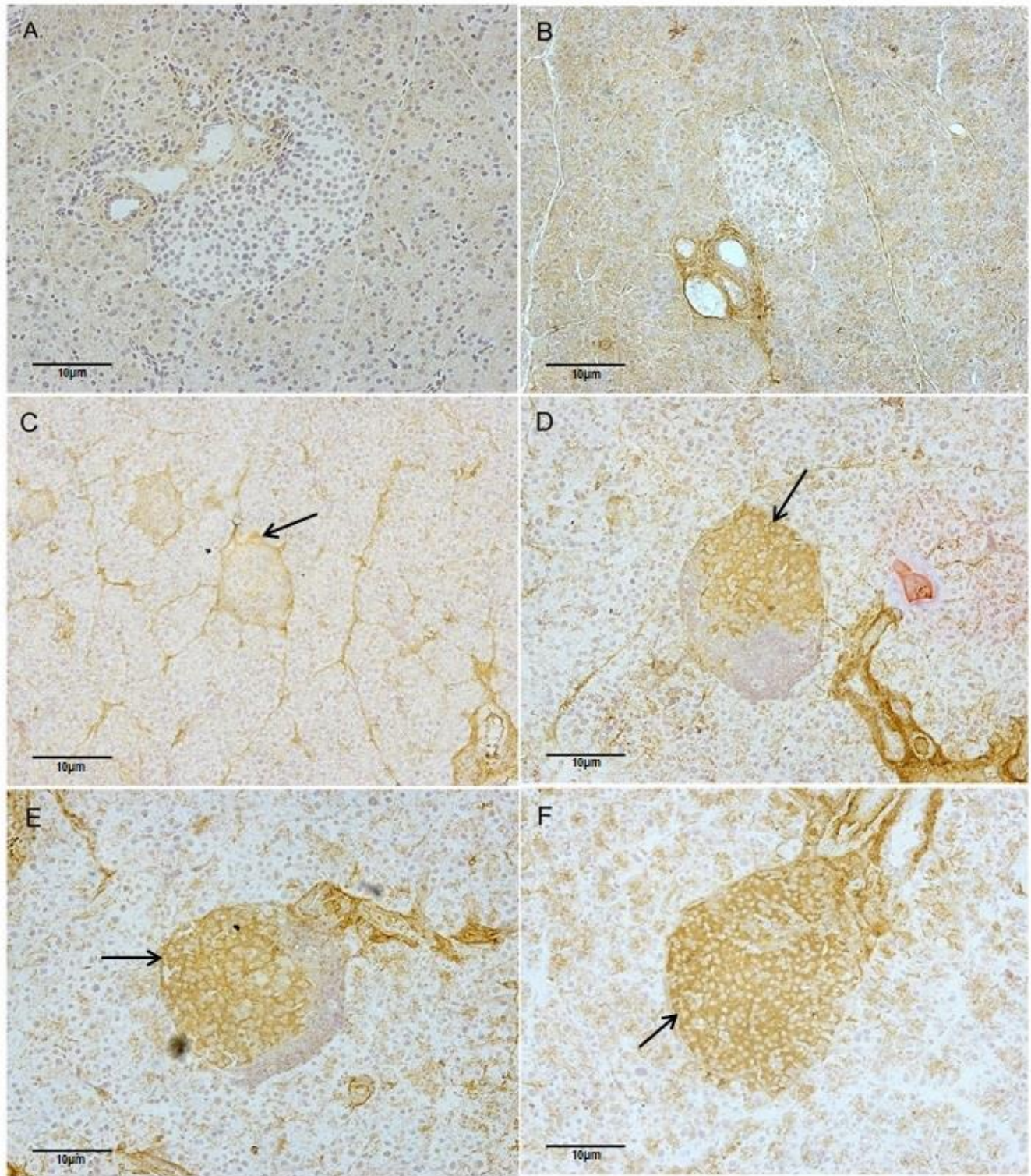


Figura 8. Prancha destacando ilhotas pancreáticas de camundongos NOD demonstrando os diferentes graus de estresse oxidativo (coloração marrom). A) Ilhota controle sem DNPH. B) Ilhota sem estresse oxidativo (Grau 0). C) Ilhota com até 25% de estresse oxidativo (Grau 1). D) Ilhota com estresse oxidativo entre 25% e 80% (Grau 2). E) Ilhota com estresse oxidativo >80% (Grau 3). F) Ilhota tomada pelo estresse oxidativo (Grau 4). Aumento de 200x.

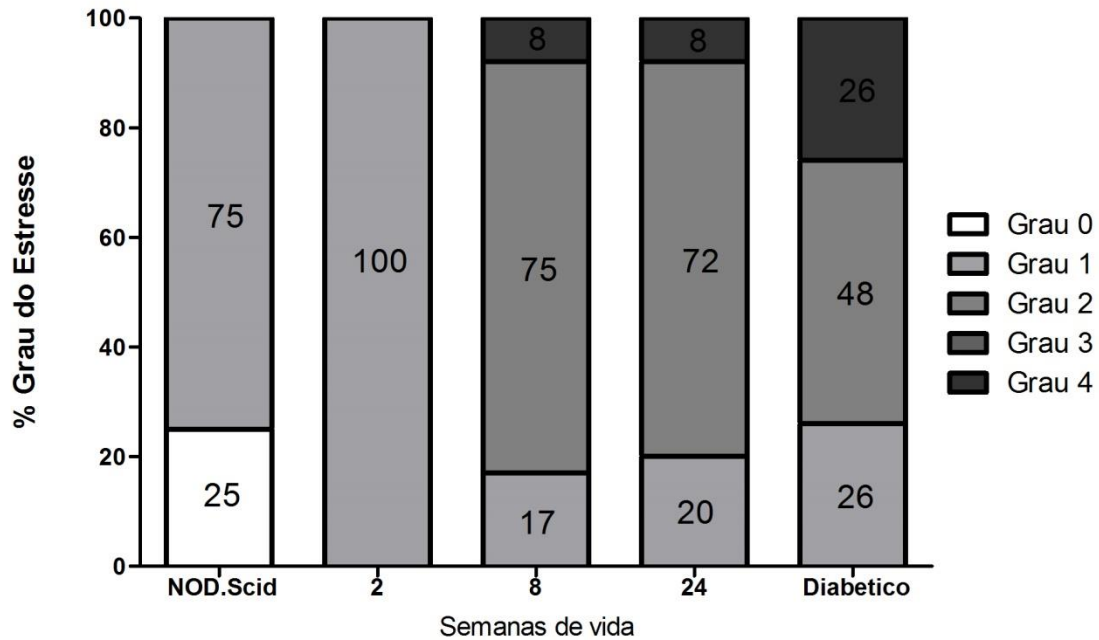


Figura 9. Classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de estresse oxidativo. A porcentagem de ilhotas com o grau de lesão está apresentada em cada bloco e coluna representativa do grupo analisado.

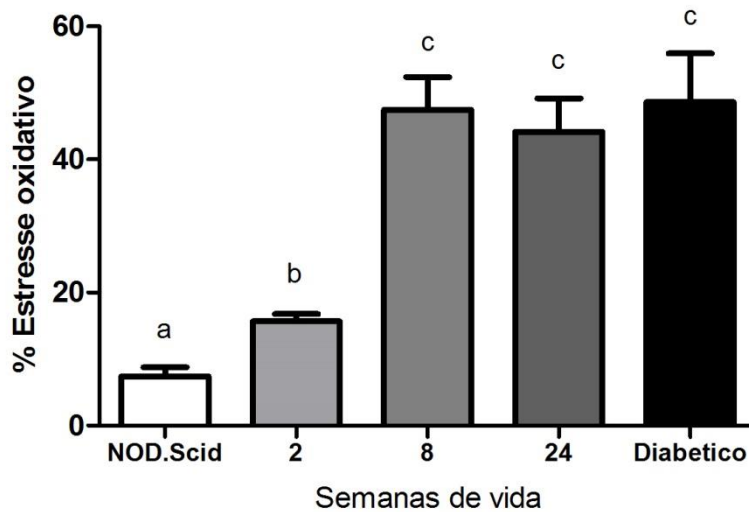


Figura 10. Percentual da área de células marcadas em ilhotas pancreáticas e os respectivos grupos experimentais de camundongos NOD (a/b: $p < 0.0001$, a/c: $p < 0.0001$ e b/c: $p < 0.001$). Análise estatística por teste estatístico de Mann-Whitney

4.2 Expressão Gênica dos Receptores *Toll-Like* (TLR2, TLR4, TLR5 E TLR6) em Ilhotas Pancreáticas empregando a Técnica de RT-PCR *One Step* em Tempo Real

TLR2 e TLR4

A expressão gênica de TLR2 (Fig. 11^a, pág. 52) foi similar entre animais de 2, 24 semanas de vida e diabéticos, não diferindo estatisticamente do controle NOD.Scid. Entretanto, em animais de 8 semanas de vida houve maior expressão de TLR2 quando comparados aos animais de 2, 24 semanas de vida ($p=0.0058$) e animais diabéticos ($p=0.009$) e quando comparados ao controle NOD.Scid ($p=0.0281$). A expressão de TLR4 (Fig. 11B, pág. 52) foi superior em animais de 8 e 24 semanas de vida com diferença estatística quando comparados ao controle NOD.Scid e aos animais diabéticos ($p<0.006$), os quais foram avaliados com a menor expressão.

TLR5 e TLR6

A expressão do mRNA de TLR5 (Fig. 11C, pág. 52) foi superior em animais de 8 e 24 semanas de vida quando comparados aos animais de 2 semanas de vida ($p=0.0281$ e $p=0.0183$, respectivamente), ao controle NOD.Scid ($p=0.0428$ e $p=0.0241$, respectivamente) e ao animal diabético ($p=0.0058$ e $p=0.0079$, respectivamente). Por fim, a expressão do mRNA de TLR6 (Fig. 11D, pág. 52) em animais de 24 semanas de vida mostrou-se alta quando comparada aos animais de 2 e 8 semanas de vida ($p=0.0097$) e também mostrou-se superior quando comparada ao controle NOD.Scid ($p=0.0079$), assim como ao animal diabético ($p=0.0143$).

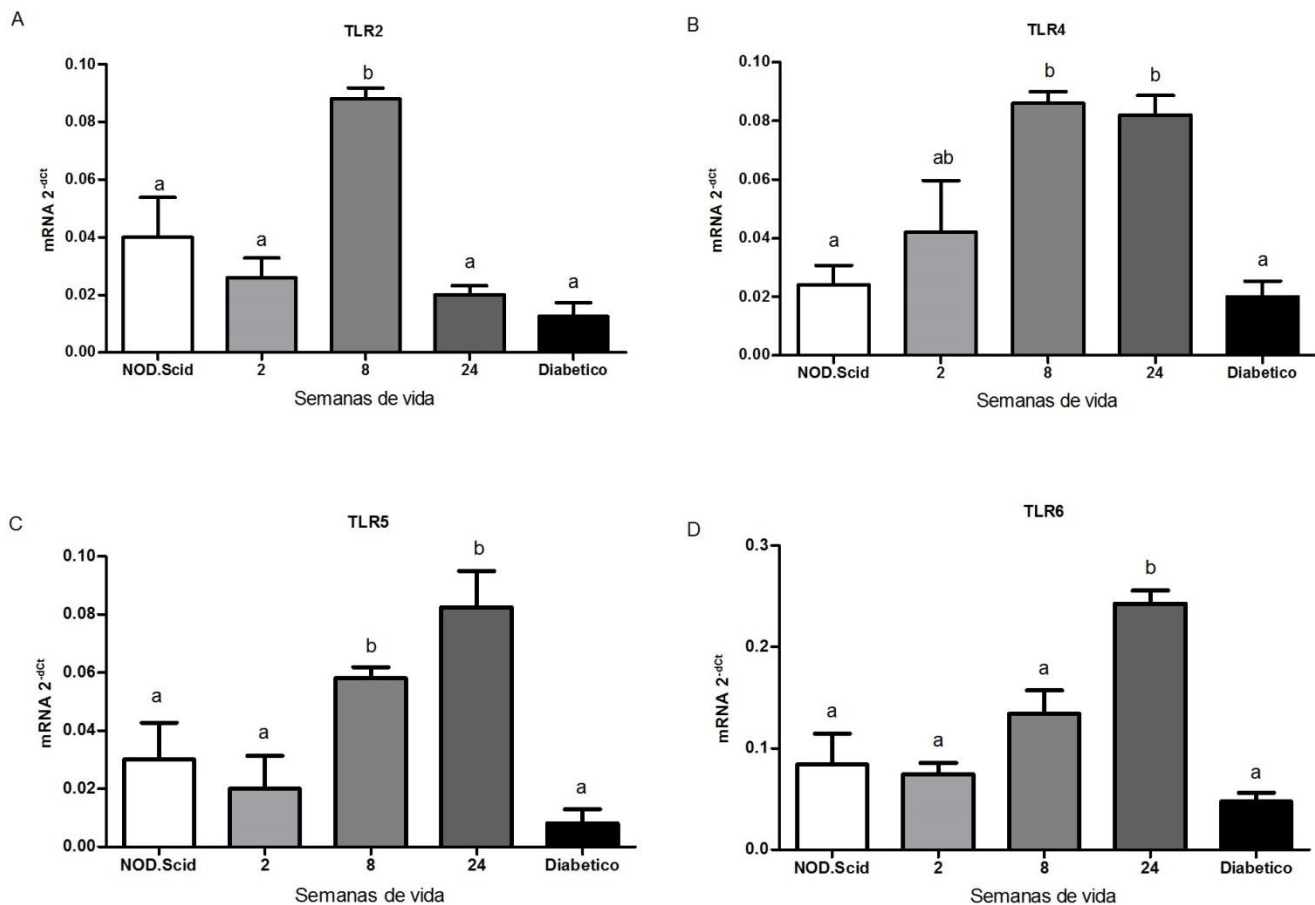


Figura 11. Análise temporal da expressão gênica dos Receptores *Toll-Like* em ilhotas pancreáticas por RT-PCR em tempo real. Camundongos NOD fêmeas representando os diferentes estágios durante a diabetogênese. Animais de 24 semanas de vida apresentaram aumento de TLR4 (B), TLR5 (C) e TLR6 (D), sendo o TLR2 (A) uma exceção com menor expressão, assim como no animal diabético que mostrou expressão reduzida em todos os TLRs analisados (a/b: $p < 0.05$). Análise estatística por teste estatístico de Mann-Whitney

4.3 Expressão Gênica dos Fatores de Regeneração Reg1 e Reg2 em Ilhotas pancreáticas empregando a Técnica de RT-PCR *One Step* em Tempo Real

Reg1 e Reg2

Diferentemente dos receptores de membrana, os genes de regeneração Reg1 e Reg2 não possuem expressão apenas em ilhotas pancreáticas, podendo ser encontrada também em tecido acinar pancreático. Os gráficos e as médias podem ser vistos na Figura 12, pág 54 e na Tabela 5, pág 79. Em ilhotas houve expressão de Reg1 muito superior em animais diabéticos e no tempo 2 semanas em relação aos tempos 4 e 16 semanas ($p=0.004$), ao tempo 8 semanas ($p=0.006$) e ao tempo 24 semanas e o controle NOD.Scid ($p=0.007$). O nível de expressão mais baixa foi encontrada nos tempos 8 e 16 semanas, que diferiram dos tempos 2 semanas ($p=0.007$), 4 semanas ($p=0.0139$ e $p=0.004$, respectivamente), 24 semanas ($p=0.0183$ e $p=0.0159$, respectivamente) e do controle NOD.Scid ($p=0.01$ e $p=0.007$, respectivamente). Na análise de Reg2, o camundongo NOD.Scid e o tempo 2 semanas apresentaram altíssima expressão em ilhotas em relação aos tempos 8, 16 e 24 semanas ($p=0.02$ e $p=0.01$, respectivamente), ao tempo 4 semanas ($p=0.02$ e $p=0.05$, respectivamente) e ao animal diabético ($p=0.007$ e $p=0.01$, respectivamente) seguido de diminuição acentuada nos outros tempos. Curiosamente, a expressão de Reg2 foi superior a de Reg1, exceto no animal diabético, em que a expressão foi equivalente.

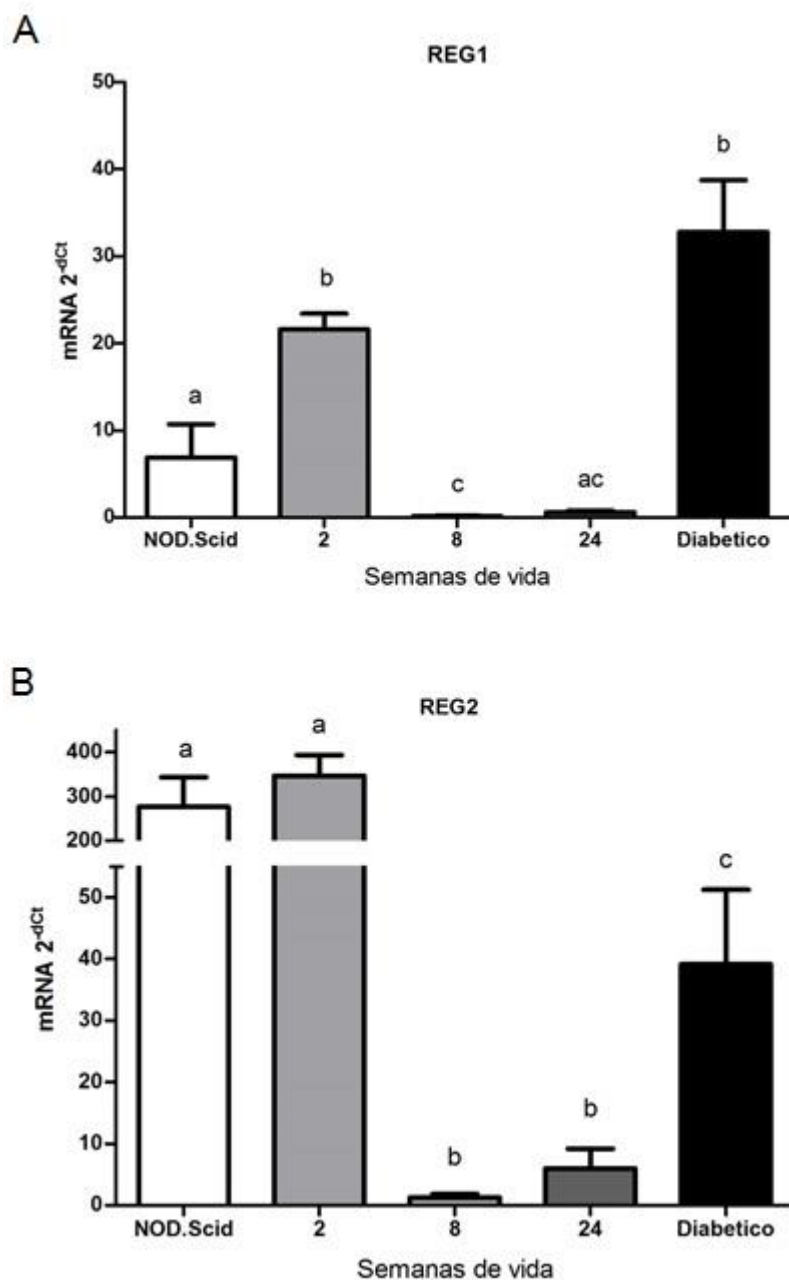


Figura 12. Análise temporal dos genes de regeneração Reg1 e Reg2 em ilhotas pancreáticas. Houve maior expressão de Reg1 (A) em animais de 2 semanas de vida e diabéticos (a/b: $p=0.0143$; b/c: $p=0.0079$; a/c: $p=0.0134$ e b/ac: $p=0.0143$). A expressão de Reg2 (B) foi superior em animais de 2 semanas de vida e no controle NOD.Scid (a/b: $p\leq 0.0286$; a/c: $p\leq 0.0286$ and b/c: $p=0.0143$). Análise estatística por teste estatístico de Mann-Whitney

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi mostrado que o estresse oxidativo foi progressivo com a idade e muito próximo do escore de insulite. Os animais de 8 e 24 semanas de vida apresentaram maior número de ilhotas com estresse moderado e avançado, com predomínio do grau moderado, além de maior número de ilhotas com o grau avançado de infiltração por leucócitos (grau 4) e predomínio do grau moderado (grau 2). Este resultado mostra que o estresse oxidativo evolui gradualmente com a idade, tornando-se mais evidente quando o animal muda do estágio pré-diabético para o estágio diabético.

Em 1998, Rabinovitch & Suarez [103], demonstraram que é possível realizar a associação da insulite no estágio pré-diabético à liberação de ROS citotóxico, como superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio, como o óxido nítrico (NO). Além disso, a produção de ROS também é responsável pela indução da lesão de células β em modelos experimentais de diabetes droga induzidos [104, 105], sendo que o NO contribui para a citotoxicidade de estroptozotocina às células β pancreáticas [106, 107]. Kolb e colaboradores (1991) [108] também verificaram que a ação de inibidores de óxido nítrico sintase (NOS) diminui a incidência de hiperglicemia, sugerindo que o NO está envolvido no mecanismo da doença. Em camundongos NOD, a exposição direta de radicais produzidos por células imunes podem levar a destruição de células β [109]. Os radicais livres envolvidos podem ser produzidos devido à produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interferon gama (IFN- γ), os quais podem ser citotóxicos às células [103, 110].

Muitos dados nos levam a crer que ROS está intimamente ligado ao dano celular. Apesar disso, outros fatores podem estar associados e mostrar que o dano pode ser determinado não apenas pela geração de ROS, mas também pela defesa antioxidante da célula e que diferentes órgãos podem exibir diferenças consideráveis na suscetibilidade ao dano citotóxico. Pacientes com DM-1 parecem ter defeitos significativos na proteção antioxidante, sendo que foi possível demonstrar redução significativa de antioxidante total em amostras de plasma e

soro de pacientes quando comparado ao controle não diabético [111]. Além disso, diversas enzimas que possuem papel chave na defesa contra ROS são incomumente baixas em ilhotas pancreáticas quando comparadas a outros tecidos, sugerindo que as ilhotas são particularmente susceptíveis ao dano induzido pelo estresse oxidativo. A expressão gênica e a atividade de diversas enzimas antioxidantes com papel chave, como as superóxido dismutase (SOD) com cobre e zinco (CuZnSOD) e manganês (MnSOD), como a glutathione peroxidase (GPx), e como a catalase, são todas significativamente diminuídas quando comparadas com outros tecidos, assim como no rim [112]. Ao realizar uso mimético de SOD, verificou-se também a prevenção da indução do DM-1 em camundongos NOD [113]. Estes dados evidenciam que a especificidade do estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas pode ser atribuída à baixa capacidade antioxidante das mesmas.

Como citado anteriormente, por volta da 8ª semana de vida é possível verificar claramente o avanço do dano às células do pâncreas devido ao estresse oxidativo e a infiltração de leucócitos na ilhota. Esta destruição leva ao significativo declínio na massa celular, que é acompanhada por um aumento aproximado de 6 vezes na taxa de replicação da mesma, sugerindo a existência de esforço regenerativo compensatório [114], mas uma vez que o nível oxidativo aumenta, este processo pode ser sobrecarregado, levando à morte da célula β .

O modelo experimental NOD.Lc7, linhagem congênita resistente ao DM-1, também desenvolve insulite invasiva em torno da 8ª semana de vida, porém com muito menos frequência que sua linhagem parental NOD [115]. Haskins e colaboradores (2004) [116] fizeram uso do marcador nitrotirosina, um produto da ação de radicais livres em resíduos de proteínas, e verificaram que o NOD.Lc7, mesmo com suas ilhotas extensivamente infiltradas, apresentou menor indicação de estresse oxidativo do que o camundongo NOD. Nesse aspecto, o camundongo NOD.Lc7 se equiparou ao controle Balb/c, que não desenvolve o DM-1. Estes resultados sugerem que as ilhotas de NOD.Lc7 são menos susceptíveis ao dano oxidativo.

Em nosso estudo, além da análise do estresse oxidativo, nós avaliamos possível conexão entre o DM-1 e a expressão dos receptores *Toll-like* (TLRs). Nos últimos anos, mecanismos de imunidade inata tem sido propostos como fatores chave no processo inflamatório de diversas doenças. Receptores reconhecedores de padrão (PRR) presentes em células de defesa atuam como identificadores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) de organismos invasores, como lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e várias proteínas [117, 118]. Esta estratégia facilita a ativação do processo imune por não ser necessária a alta especificidade ao patógeno. Entre os PRRs, os TLRs possuem papel crítico na ativação e regulação das respostas imunes adaptativas e inatas que ao final levam à eliminação de patógenos invasores em mamíferos. Adicionalmente, a resposta imune inata via TLRs ativados é acompanhada da produção de proteínas inflamatórias. Além disso, há evidências recentes que sugerem que moléculas não microbianas também possam atuar na ativação dos TLRs [52, 119-121].

De acordo com Johnson e colaboradores (2003) [119], não apenas organismos invasores são detectados via TLRs. Eles também podem reconhecer várias moléculas expressas pelo próprio hospedeiro, especialmente se estas moléculas são indicadoras de estresse ou doença [52], ou modificadas por processos ocorrido na manifestação da doença. Como exemplo, podemos citar o processo de oxidação [120] e o colapso de componentes da matriz extracelular [121] em locais de inflamação ou estresse oxidativo, que convertem moléculas próprias em ligantes para a ativação via TLRs.

Estes agonistas endógenos liberados no próprio organismo devem causar respostas inflamatórias estéreis e, simultaneamente, respostas imunes desnecessárias. Quando estes TLRs são estimulados por quaisquer ligantes, são recrutadas moléculas adaptadoras para ativar vias de sinalização distais aos receptores. Após sua ativação, há o início de ampla cascata de sinalização, via interações e reações de fosforilação com de 59 outros adaptadores que culminam na ativação de complexos como IKK $\alpha/\beta/\gamma$ resultando na ativação do fator de transcrição NF κ B. Também pode ocorrer a ativação das quinases relacionadas à

inflamação, como a Jun N-Terminal (JNK) e a proteína cinase ativada por mitógeno (p38), tendo como resultado a expressão de genes alvo-inflamatórios como o ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e citocinas [122].

Em nossos resultados, verificamos que camundongos NOD com 2 semanas de vida, o animal diabético e o controle NOD.Scid mostram um perfil similar de expressão em todos os TLRs estudados. Eles apresentaram menor expressão gênica em todos os TLRs, com exceção para o TLR2, em que a diminuição também foi observada no animal com 24 semanas de vida. Após as 2 semanas de vida, a expressão de TLR2 se manteve constante e aumentada, sugerindo atividade deste receptor no estágio pré-diabético, que diminui quando há prevalência da insulite invasiva e destrutiva (Grau 4). Dados de literatura mostraram que o camundongo NOD deficiente em TLR2, mas não deficiente em TLR4, apresentaram diminuição da insulite e incidência do diabetes, evidenciando que TLR2 possui um papel importante no desenvolvimento da doença [123].

Apesar disso, o tratamento de camundongos NOD com agonista específico Pam3CSK4 (um agonista sintético de TLR), levou à diminuição da incidência de DM-1, a qual foi associada ao aumento no número e função de células T regulatórias (Tregs) [124] e da geração de células dendríticas tolerogênicas [125].

A este respeito, enquanto a sinalização de TLR2 em células apresentadoras de antígenos (APCs) pode promover o DM-1 através do preparo de células T diabetogênicas quando células β são danificadas [123], a sinalização também pode conferir proteção através de mecanismos imunoregulatórios por Tregs, quando o dano em células β não é evidente. Dado estas diferentes funções, é muito importante entender como a estimulação regula o balanço entre células T efectoras e Tregs dependendo do contexto, além do fato de que a deficiência de TLR2 também pode conferir proteção contra o DM-1.

Recentemente, Li e colaboradores (2012) [126] encontraram correlação positiva em camundongos NOD de 10 a 16 semanas de vida, sobre o aumento de TLR4 em células beta e o aumento da expressão gênica do grupo de alta

mobilidade caixa B1 (HMGB1), um gene relacionado à ativação da via de sinalização de NFκB. Resultados similares foram observados no presente trabalho em animais com 8 e 24 semanas de vida. Além disso, verificamos que ocorre diminuição acentuada de TLR4 em animais com 2 semanas de vida e no animal diabético, assim como no controle NOD.Scid. Este resultado pode ser devido o número baixo de ilhotas encontrado no tempo 2 semanas, assim como no animal diabético, juntamente com o fato de que o TLR4 pode ser considerado um marcador de células β.

Estudos confirmam que o LPS, um ligante de TLR4, inibe a expressão gênica de insulina em ilhotas humanas [127-129]. A ativação de TLR4 pelo LPS ativa a sinalização do NFκB e a expressão de citocinas pró-inflamatórias [130], as quais podem ter ação imediata nas células β devido sua co-localização [126], reduzindo a produção de insulina. Quando o animal se torna diabético, muitas ilhotas estão tomadas pelo infiltrado e seriamente lesadas, resultando na morte de células beta, o que explicaria a baixa expressão de TLR4 encontrada no pâncreas destes animais.

TLR5 e TLR6 foram expressos de modo igualmente elevado em ilhotas pancreáticas de camundongos NODC de 8 e 24 semanas de vida. A flagelina é o ligante de TLR5 [90] e poucos estudos foram realizados para este receptor sobre o DM-1, porém sua expressão é conhecida tanto em ilhotas de camundongos quanto de humanos [131]. Mohammad e colaboradores (2006) [132] mostraram que a expressão gênica de TLR5 em macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de medula óssea foi superior em animais diabéticos do que em animais pré-diabéticos com 10 semanas de vida. Também foi constatado que sua expressão não foi afetada por altas concentrações de glicose. Os macrófagos diferenciados são capazes de reconhecer patógenos diretamente através de TLRs, produzindo citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas [69]. Após a ativação, também produzem radicais livres de oxigênio e nitrogênio, além de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral α (TNF-α) [133-135]. Dessa maneira, é possível que o TLR5 esteja mais intimamente associado às células que participam do início da

resposta inflamatória do DM-1, porém os diferentes mecanismos que podem afetar a regulação na expressão gênica ainda não são conhecidos.

Outra questão importante a analisar no desenvolvimento do DM-1 e no avanço da insulite é a ativação dos mecanismos de regeneração. Dessa forma, avaliamos a expressão dos genes de regeneração Reg1 e Reg2 nos diferentes estágios durante a diabetogênese do camundongo NOD. Os genes da família Reg foram associados ao processo de regeneração após o isolamento do material genético de ilhotas pancreáticas em regeneração [33]. Ao compararmos a expressão dos genes Reg1 e Reg2 em ilhotas aos Receptores *Toll-Like*, foi possível verificar um perfil oposto de expressão gênica. Quando havia maior percentual de ilhotas infiltradas (período pré-diabético), nós observamos o aumento da expressão dos TLRs e de células marcadas pelo estresse oxidativo seguido de redução da expressão de Reg1 e Reg2. A alta expressão dos genes Reg observada no controle NOD.Scid e em animais de 2 semanas de vida pode sugerir a conservação da capacidade regenerativa nas ilhotas, o qual pode estar significativamente reduzido no período pré-diabético, como evidenciado pela redução da expressão gênica de animais de 8 e 24 semanas de vida. Curiosamente, a expressão de Reg1 e Reg2 em animais diabéticos foi mais elevada quando comparada com animais de 8 e 24 semanas de vida. Este fato pode estar relacionado com o aumento da expressão na fase de resolução do processo inflamatório, conhecido por estar associado à ativação do processo regenerativo [136].

Estudos anteriores têm mostrado que os genes Reg são altamente expressos no pâncreas em diversos modelos diabéticos, incluindo o camundongo NOD [41, 137-140]. O gene Reg1, o que é normalmente expresso em tecido acinar, também pode ser induzido em ilhotas durante a regeneração [141], como demonstrado aqui. Além disso, Reg2 poderia constituir um potente fator endógeno envolvendo a regeneração de células beta durante o desenvolvimento do diabetes. Em pâncreas total de camundongos NOD, Huszarik e colaboradores (2010) [43] verificaram que a família Reg apresenta expressão elevada com a

idade, e Reg2 é o mais expresso em camundongos diabéticos após tratamento com adjuvante completo de Freund (CFA). Em camundongos NOD, a imunoterapia com CFA é efetiva não apenas na prevenção do diabetes espontâneo, mas também no processo de restauração da auto-tolerância a auto-antígenos na ilhota mediado por células T natural killer que suprimem a autoreatividade de células T [142]. Hill e colaboradores (2013) [143] também verificaram o papel dominante de Reg2 na regeneração endógena de células β após tratamento com interleucina (IL)-22.

A diferença de comportamento dos genes Reg1 e Reg2 indica que eles podem estar envolvidos em diferentes funções fisiológicas, como os processos de diferenciação e neogênese de células β em ilhotas pancreáticas. Sanchez e colaboradores (2000) [42] encontraram a expressão do gene Reg no compartimento exócrino, mas não endócrino no pâncreas de camundongos NOD. Entretanto, alguns autores não excluem a possibilidade de que Reg seja sintetizado em células acinares e preferencialmente acumulado em ilhotas durante o períodos de proliferação de células beta [144]. Bonner e colaboradores (2010) [145] também sugerem que células β em apoptose secretam fatores que podem estimular a proteína histônica PSP/reg em ratos, que é idêntica ao mRNA Reg descrito por Terazono e colaboradores (1988) [33], induzindo a regeneração e a proliferação celular em células vizinhas.

Dados de literatura mostram que o receptor Reg de superfície celular que se liga a proteína Reg exibe 97% de homologia com o gene exostose múltipla 3 (EXTL3) [146]. Os mecanismos de interação entre Reg e seu receptor ainda não estão claros, porém é conhecido que a alta expressão de EXTL3 aumenta a atividade de NF κ B induzido pelo TNF α [147]. Além disso, Nishimune e colaboradores (2000) [148] sugerem que a proteína Reg2/PAP possa atuar como um fator neurotrófico de subpopulação de neurônios motores, por meio de estimulação da via de sinalização que envolve fosfato-inositol-3-kinase, a quinase Akt e NF κ B. A proteína Akt ativa o NF κ B [149]. Entretanto a ativação direta de Reg2 ainda não foi demonstrada. A ativação do fator de transcrição NF κ B também

é comum à família TLR após ativação de diversas proteínas adaptadoras, exceto para TLR3 [150].

Estes achados mostram que o processo inflamatório e os fatores de regeneração podem ter vias de sinalização ou perfis de ação muito mais próximos do que pensamos. É possível que o processo de regeneração possa ocorrer durante a diabetogênese. Entretanto, ainda não está claro se esse processo ocorre por meio de auto-replicação de células β maduras, neogênese de células progenitoras ou através de transdiferenciação. Experimentos que possam subsidiar questões como se a regeneração pode ser inibido ou se o seu declínio dá espaço para a atuação de fatores inflamatórios seriam importantes na elucidação destes eventos durante a diabetogênese.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o desenvolvimento do diabetes pode estar relacionado:

- À progressão do estresse oxidativo acompanha o aumento do infiltrado celular em ilhotas pancreáticas.
- À redução na expressão gênica de Reg1 em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD de 8 e 24 semanas de vida, além da expressão elevada de Reg2 em ilhotas de animais com mínima presença/ausência do infiltrado, além do controle NOD.Scid.
- Ao aumento da expressão gênica de TLR4, TLR5 e TLR6 encontrada em células das ilhotas pancreáticas de camundongo NOD de 8 e 24 semanas de vida.
- Ao contraste encontrado entre Reg1 e Reg2 frente aos Receptores *Toll-Like* no período pré-diabético, em que Reg1 e Reg2 apresentaram expressão gênica reduzida, enquanto os TLRs apresentaram maior expressão.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cerca de 20 anos após a descoberta do papel do receptor Toll de *Drosophila melanogaster* na defesa contra infecções fúngicas, e da identificação dos receptores *Toll-Like* (TLRs) como os homólogos mamíferos de Toll, diversas hipóteses têm sido estabelecidas em relação a muitas doenças. Esta descoberta permitiu a abertura de novas linhas investigativas ligadas à imunidade, levando a progressão do entendimento dos mecanismos de reconhecimento do sistema imune inato. Ainda assim, devido à amplitude do sistema imune, muitos mecanismos permanecem desconhecidos.

Em conjunto, nossos resultados podem ser trabalhados como dados controle em experimentos temporais que visam tratamentos focados na prevenção da doença. Dessa maneira, seria possível identificar o momento das oscilações biológicas em resposta à atuação de compostos naturais de efeito protetor já conhecido, facilitando a interpretação dos mecanismos imunológicos no período determinado. Além disso, seria possível verificar se a intervenção positiva do tratamento no processo inflamatório afetaria o balanço da regeneração observada neste trabalho. Seria possível que a diminuição do estresse oxidativo levasse a maior expressão dos genes de regeneração Reg1 e Reg2? A alta expressão dos TLRs ocorre devido à ação do estresse oxidativo ou devido à diminuição da expressão de Reg1 e Reg2? Sendo assim, diferentes combinações podem ser estudadas, resultando em um trabalho capaz de mostrar diferentes perspectivas frente às respostas imunológicas do processo inflamatório do DM-1.

8. REFERÊNCIAS

1. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2013. **29**: p. 67-74.
2. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-1300.
3. Roep, B.O. and M. Peakman, *Diabetogenic T lymphocytes in human type 1 diabetes*. Current opinion in immunology, 2011. **23**(6): p. 746-753.
4. Roep, B.O., *The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure*. Diabetologia, 2003. **46**(3): p. 305-321.
5. Roep, B.O., *T-cell responses to autoantigens in IDDM: the search for the Holy Grail*. Diabetes, 1996. **45**(9): p. 1147-1156.
6. Lefebvre, D.E., et al., *Dietary proteins as environmental modifiers of type 1 diabetes mellitus*. Annu Rev Nutr, 2006. **26**: p. 175-202.
7. Schranz, D.B.a.L., Å., *Immunology in diabetes an update*. Diabetes Metab. Rev., 1998. **14**(1): p. 3-29.
8. Vehik, K. and D. Dabelea, *The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof?* Diabetes/metabolism research and reviews, 2011. **27**(1): p. 3-13.
9. Ziegler, A.-G., et al., *Accelerated progression from islet autoimmunity to diabetes is causing the escalating incidence of type 1 diabetes in young children*. Journal of autoimmunity, 2011. **37**(1): p. 3-7.
10. Patterson, C.C., et al., *Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study*. The Lancet, 2009. **373**(9680): p. 2027-2033.
11. Bach, J.-F., *Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease*. Endocrine reviews, 1994. **15**(4): p. 516-542.
12. Makino, S., et al., *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. Jikken dobutsu. Experimental animals, 1980. **29**(1): p. 1.
13. Pavin, E.J. and R.d.L. Zollner, *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*. Arq. bras. endocrinol. metab, 1994. **38**(2): p. 105-8.
14. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, *The NOD mouse: a model of immune dysregulation*. Annu. Rev. Immunol., 2005. **23**: p. 447-485.
15. Wong, F. and C. Janeway Jr, *The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse*. Research in immunology, 1997. **148**(5): p. 327.
16. Shultz, L.D., et al., *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice*. The Journal of Immunology, 1995. **154**(1): p. 180-191.
17. Baxter, A.G. and A. Cooke, *Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice*. Diabetes, 1993. **42**(11): p. 1574-1578.
18. Larochelle, A., et al., *Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy*. Nature medicine, 1996. **2**(12): p. 1329-1337.
19. Hogan, C.J., et al., *Engraftment and development of human CD34+-enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice*. Blood, 1997. **90**(1): p. 85-96.
20. Wang, J.C., M. Doedens, and J.E. Dick, *Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay*. Blood, 1997. **89**(11): p. 3919-3924.
21. Styskal, J., et al., *Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models?* Free Radical Biology and Medicine, 2012. **52**(1): p. 46-58.

22. Jiang, F., Y. Zhang, and G.J. Dusting, *NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair*. *Pharmacol Rev*, 2011. **63**(1): p. 218-42.
23. Oktyabrsky, O. and G. Smirnova, *Redox regulation of cellular functions*. *Biochemistry (Moscow)*, 2007. **72**(2): p. 132-145.
24. Dröge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiological reviews*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
25. Nathan, C. and A. Cunningham-Bussel, *Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species*. *Nature Reviews Immunology*, 2013. **13**(5): p. 349-361.
26. Baynes, J.W. and S.R. Thorpe, *Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm*. *Diabetes*, 1999. **48**(1): p. 1-9.
27. Banerjee, M. and R.R. Bhonde, *Islet generation from intra islet precursor cells of diabetic pancreas: in vitro studies depicting in vivo differentiation*. *Jop*, 2003. **4**(4): p. 137-145.
28. Seino, S., T. Shibasaki, and K. Minami, *Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes*. *The Journal of clinical investigation*, 2011. **121**(6): p. 2118.
29. Porat, S., *New sources of pancreatic beta cells*. *Current diabetes reports*, 2007. **7**(4): p. 304-308.
30. Stanger, B.Z., A.J. Tanaka, and D.A. Melton, *Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver*. *Nature*, 2007. **445**(7130): p. 886-891.
31. Sherry, N.A., et al., *Effects of autoimmunity and immune therapy on β -cell turnover in type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2006. **55**(12): p. 3238-3245.
32. Yonemura, Y., et al., *Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors: evidence of islet B-cell regeneration*. *Diabetes*, 1984. **33**(4): p. 401-404.
33. Terazono, K., et al., *A novel gene activated in regenerating islets*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(5): p. 2111-2114.
34. Mally, M.I., et al., *Developmental gene expression in the human fetal pancreas*. *Pediatric research*, 1994. **36**(4): p. 537-544.
35. Baeza, N., et al., *Reg protein: a potential beta-cell-specific growth factor?* *Diabetes & metabolism*, 1996. **22**(4): p. 229.
36. Perfetti, R., et al., *Regenerating (reg) and insulin genes are expressed in prepancreatic mouse embryos*. *Journal of molecular endocrinology*, 1996. **17**(1): p. 79-88.
37. Okamoto, H., *The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic β -cells*. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, 1999. **6**(3): p. 254-262.
38. Okamoto, H. and S. Takasawa, *Recent Advances in the Okamoto Model The CD38-Cyclic ADP-Ribose Signal System and the Regenerating Gene Protein (Reg)-Reg Receptor System in β -Cells*. *Diabetes*, 2002. **51**(suppl 3): p. S462-S473.
39. Takasawa, S., et al., *Cyclin D1 activation through ATF-2 in Reg-induced pancreatic β -cell regeneration*. *FEBS letters*, 2006. **580**(2): p. 585-591.
40. Unno, M., et al., *Production and Characterization of Reg Knockout Mice: Reduced Proliferation of Pancreatic β -Cells in Reg Knockout Mice*. *Diabetes*, 2002. **51**(suppl 3): p. S478-S483.
41. Baeza, N., et al., *Specific reg II gene overexpression in the non-obese diabetic mouse pancreas during active diabetogenesis*. *FEBS letters*, 1997. **416**(3): p. 364-368.

42. Sanchez, D., et al., *Overexpression of the reg Gene In Non-obese Diabetic Mouse Pancreas During Active Diabetogenesis Is Restricted to Exocrine Tissue*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2000. **48**(10): p. 1401-1410.
43. Huszarik, K., et al., *Adjuvant Immunotherapy Increases β Cell Regenerative Factor Reg2 in the Pancreas of Diabetic Mice*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(9): p. 5120-5129.
44. Dungan, K.M., J.B. Buse, and R.E. Ratner, *Effects of therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus with a peptide derived from islet neogenesis associated protein (INGAP)*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2009. **25**(6): p. 558-565.
45. De León, D.D., et al., *Identification of transcriptional targets during pancreatic growth after partial pancreatectomy and exendin-4 treatment*. Physiological genomics, 2006. **24**(2): p. 133-143.
46. Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson, *The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. Cell, 1988. **52**(2): p. 269-279.
47. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-397.
48. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nature immunology, 2010. **11**(5): p. 373-384.
49. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70 role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(17): p. 15028-15034.
50. Roelofs, M.F., et al., *Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. The Journal of Immunology, 2006. **176**(11): p. 7021-7027.
51. Park, J.S., et al., *Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(9): p. 7370-7377.
52. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(2): p. 558-561.
53. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-1531.
54. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science Signaling, 2004. **303**(5663): p. 1526.
55. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(13): p. 10229-10233.
56. Johnson, G.B., et al., *Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(10): p. 5233-5239.
57. Scheibner, K.A., et al., *Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(2): p. 1272-1281.
58. Calderwood, S.K., S.S. Mambula, and P.J. GRAY, *Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007. **1113**(1): p. 28-39.
59. Mambula, S.S. and S.K. Calderwood, *Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(11): p. 7849-7857.
60. Bauer, M., et al., *Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(8): p. 5000-5007.

61. Gill, R., A. Tsung, and T. Billiar, *Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(9): p. 1121-32.
62. Uematsu, S. and S. Akira, *Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands*, in *Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity* 2008, Springer. p. 1-20.
63. Marshak-Rothstein, A., *Toll-like receptors in systemic autoimmune disease*. *Nature Reviews Immunology*, 2006. **6**(11): p. 823-835.
64. Joosten, L.A.B., et al., *Toll-Like Receptor 2 Pathway Drives Streptococcal Cell Wall-Induced Joint Inflammation: Critical Role of Myeloid Differentiation Factor 88*. *The Journal of Immunology*, 2003. **171**(11): p. 6145-6153.
65. Kerfoot, S.M., et al., *TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease*. *The Journal of Immunology*, 2004. **173**(11): p. 7070-7077.
66. Eriksson, U., et al., *Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity*. *Nature medicine*, 2003. **9**(12): p. 1484-1490.
67. Lang, K.S., et al., *Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease*. *Nature medicine*, 2005. **11**(2): p. 138-145.
68. Yumoto, H., et al., *Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion*. *Infection and immunity*, 2005. **73**(12): p. 8050-8059.
69. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
70. Janeway, C.A. *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
71. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. *Nature immunology*, 2004. **5**(10): p. 987-995.
72. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-802.
73. Lauw, F.N., D.R. Caffrey, and D.T. Golenbock, *Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin*. *Trends in Immunology*, 2005. **26**(10): p. 509-511.
74. Dasu, M.R., et al., *TLR2 expression and signaling-dependent inflammation impair wound healing in diabetic mice*. *Lab Invest*, 2010. **90**(11): p. 1628-36.
75. Brightbill, H.D., et al., *Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors*. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 732-736.
76. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2*. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 736-739.
77. Takeuchi, O., et al., *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. *Immunity*, 1999. **11**(4): p. 443-451.
78. Underhill, D.M., et al., *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. *Nature*, 1999. **401**(6755): p. 811-815.
79. Drage, M.G., et al., *TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular immunology*, 2009. **258**(1): p. 29-37.
80. Dasu, M.R., et al., *High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes mechanism of activation*. *Diabetes*, 2008. **57**(11): p. 3090-3098.
81. Fiset, P.L., et al., *The Lip lipoprotein from Neisseria gonorrhoeae stimulates cytokine release and NF- κ B activation in epithelial cells in a Toll-like receptor 2-dependent manner*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(47): p. 46252-46260.

82. Takeda, K., O. Takeuchi, and S. Akira, *Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors*. Journal of endotoxin research, 2002. **8**(6): p. 459-463.
83. Alexopoulou, L., et al., *Hyporesponsiveness to vaccination with Borrelia burgdorferi OspA in humans and in TLR1-and TLR2-deficient mice*. Nature medicine, 2002. **8**(8): p. 878-884.
84. Buwitt-Beckmann, U., et al., *Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides*. European journal of immunology, 2005. **35**(1): p. 282-289.
85. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-2088.
86. Hoshino, K., et al., *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(7): p. 3749-3752.
87. Jiang, Q., et al., *Cutting edge: lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF- κ B*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(7): p. 3541-3544.
88. da Silva Correia, J., et al., *Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(24): p. 21129-21135.
89. Lien, E., et al., *Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(4): p. 497-504.
90. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1099-1103.
91. Eaves-Pyles, T., et al., *Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I κ B α degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(2): p. 1248-1260.
92. Liaudet, L., et al., *Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis*. Shock, 2003. **19**(2): p. 131-137.
93. Gewirtz, A.T., *TLRs in the Gut. III. Immune responses to flagellin in Crohn's disease: good, bad, or irrelevant?* American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2007. **292**(3): p. G706-G710.
94. Ventura-Oliveira, D., et al., *Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice*. Brazilian journal of medical and biological research, 2002. **35**(11): p. 1347-1355.
95. Vieira, K.P., et al., *Ganglioside GM1 effects on the expression of nerve growth factor (NGF), Trk-A receptor, proinflammatory cytokines and on autoimmune diabetes onset in non-obese diabetic (NOD) mice*. Cytokine, 2008. **42**(1): p. 92-104.
96. Leiter, E.H., *The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus*. Current Protocols in Immunology, 2001: p. 15.9. 1-15.9. 23.
97. Li, D.-S., et al., *A protocol for islet isolation from mouse pancreas*. Nature protocols, 2009. **4**(11): p. 1649-1652.
98. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic acids research, 2001. **29**(9): p. e45-e45.
99. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST $\text{\textcircled{C}}$) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic acids research, 2002. **30**(9): p. e36-e36.
100. Pfaffl, M.W., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnology letters, 2004. **26**(6): p. 509-515.

101. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method*. Nature protocols, 2008. **3**(6): p. 1101-1108.
102. Kikutani, H. and S. Makino, *The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains*. Advances in immunology, 1992. **51**: p. 285-322.
103. Rabinovitch, A. and W.L. Suarez-Pinzon, *Cytokines and their roles in pancreatic islet β -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus*. Biochemical pharmacology, 1998. **55**(8): p. 1139-1149.
104. Heikkila, R.E., et al., *Alloxan-induced diabetes—evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate*. Biochemical pharmacology, 1976. **25**(9): p. 1085-1092.
105. Malaisse, W.J., *Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell: A new hypothesis*. Biochemical pharmacology, 1982. **31**(22): p. 3527-3534.
106. Kwon, N.S., et al., *Nitric oxide generation from streptozotocin*. The FASEB journal, 1994. **8**(8): p. 529-533.
107. Lukic, M., et al., *Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozotocin in mice*. Biochemical and biophysical research communications, 1991. **178**(3): p. 913-920.
108. Kolb, H., et al., *Suppression of low dose streptozotocin induced diabetes in mice by administration of a nitric oxide synthase inhibitor*. Life sciences, 1991. **49**(25): p. PL213-PL217.
109. Nathan, C.F. and S. Tsunawaki. *Secretion of toxic oxygen products by macrophages: regulatory cytokines and their effects on the oxidase*. in *Biochemistry of Macrophages*.(D. Evered, J. Nugent and M. O'Connor, eds). Ciba Foundation Symposium. 2009.
110. Rabinovitch, A., et al., *Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1996. **81**(9): p. 3197-202.
111. Maxwell, S., et al., *Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus*. European journal of clinical investigation, 1997. **27**(6): p. 484-490.
112. Lenzen, S., J. Drinkgern, and M. Tiedge, *Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. **20**(3): p. 463-466.
113. Piganelli, J.D., et al., *A metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic inhibits adoptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone*. Diabetes, 2002. **51**(2): p. 347-355.
114. Sreenan, S., et al., *Increased beta-cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse*. Diabetes, 1999. **48**(5): p. 989-996.
115. McDuffie, M., *Derivation of Diabetes-Resistant Congenic Lines from the Nonobese Diabetic Mouse*. Clinical Immunology, 2000. **96**(2): p. 119-130.
116. Haskins, K., et al., *Role for oxidative stress in the regeneration of islet beta cells?* Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research, 2004. **52**(1): p. 45-49.
117. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 782-787.
118. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nature immunology, 2001. **2**(8): p. 675-680.
119. Johnson, G.B., G.J. Brunn, and J.L. Platt, *Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists*. Critical Reviews™ in Immunology, 2003. **23**(1-2).

120. Buttari, B., et al., *Oxidized β 2-glycoprotein I induces human dendritic cell maturation and promotes a T helper type 1 response*. *Blood*, 2005. **106**(12): p. 3880-3887.
121. Termeer, C., et al., *Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4*. *The Journal of experimental medicine*, 2002. **195**(1): p. 99-111.
122. Muzio, M., et al., *The human Toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)*. *The Journal of experimental medicine*, 1998. **187**(12): p. 2097-2101.
123. Kim, H.S., et al., *Toll-like Receptor 2 Senses β -Cell Death and Contributes to the Initiation of Autoimmune Diabetes*. *Immunity*, 2007. **27**(2): p. 321-333.
124. Filippi, C.M., et al., *TLR2 signaling improves immunoregulation to prevent type 1 diabetes*. *European journal of immunology*, 2011. **41**(5): p. 1399-1409.
125. Kim, D.-H., et al., *Inhibition of autoimmune diabetes by TLR2 tolerance*. *The Journal of Immunology*, 2011. **187**(10): p. 5211-5220.
126. Li, M., et al., *Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes*. *Experimental & molecular medicine*, 2012. **44**(4): p. 260-267.
127. Garay-Malpartida, H.M., et al., *Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis*. *BMC immunology*, 2011. **12**(1): p. 18.
128. VIVES-PI, M., et al., *Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2003. **133**(2): p. 208-218.
129. Amyot, J., et al., *Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-like receptor-4 and NF- κ B signaling*. *PloS one*, 2012. **7**(4): p. e36200.
130. Lu, Y.-C., W.-C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*, 2008. **42**(2): p. 145-151.
131. Giarratana, N., et al., *A vitamin D analog down-regulates proinflammatory chemokine production by pancreatic islets inhibiting T cell recruitment and type 1 diabetes development*. *The Journal of Immunology*, 2004. **173**(4): p. 2280-2287.
132. Mohammad, M.K., et al., *Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse*. *International Immunology*, 2006. **18**(7): p. 1101-1113.
133. Faust, A., et al., *Role of macrophages and cytokines in B-cell death*, in *Lessons from Animal Diabetes VI*, E. Shafir, Editor 1996, Birkhäuser Boston. p. 47-56.
134. Gurlo, T., K. Kawamura, and H. von Grafenstein, *Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway*. *The Journal of Immunology*, 1999. **163**(11): p. 5770-5780.
135. Arnush, M., et al., *Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes*. *The Journal of Immunology*, 1998. **160**(6): p. 2684-2691.
136. Hasturk, H., et al., *Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo*. *The Journal of Immunology*, 2007. **179**(10): p. 7021-7029.
137. Qiu, L., E.O. List, and J.J. Kopchick, *Differentially expressed proteins in the pancreas of diet-induced diabetic mice*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005. **4**(9): p. 1311-1318.
138. Planas, R., et al., *Reg (regenerating) gene overexpression in islets from non-obese diabetic mice with accelerated diabetes: role of IFN β* . *Diabetologia*, 2006. **49**(10): p. 2379-2387.

139. Lu, Y., et al., *Activation of the Reg family genes by pancreatic-specific IGF-I gene deficiency and after streptozotocin-induced diabetes in mouse pancreas*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2006. **291**(1): p. E50-E58.
140. Baeza, N.J., et al., *Pancreatic regenerating gene overexpression in the nonobese diabetic mouse during active diabetogenesis*. Diabetes, 1996. **45**(1): p. 67-70.
141. Iovanna, J.L. and J.-C. Dagorn, *The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a short N-terminal peptide*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005. **1723**(1): p. 8-18.
142. Lee, I.-F., et al., *Regulation of autoimmune diabetes by complete Freund's adjuvant is mediated by NK cells*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(2): p. 937-942.
143. Hill, T., et al., *The involvement of interleukin-22 in the expression of pancreatic beta cell regenerative Reg genes*. Cell Regeneration, 2013. **2**(1): p. 1-11.
144. Miyaura, C., et al., *Expression of reg/PSP, a pancreatic exocrine gene: relationship to changes in islet β -cell mass*. Molecular Endocrinology, 1991. **5**(2): p. 226-234.
145. Bonner, C., et al., *INS-1 cells undergoing caspase-dependent apoptosis enhance the regenerative capacity of neighboring cells*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2799-2808.
146. Kobayashi, S., et al., *Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic β -cell regeneration factor*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(15): p. 10723-10726.
147. Mizuno, K., S. Irie, and T.-A. Sato, *Overexpression of EXTL3/EXTR1 enhances NF- κ B activity induced by TNF- α* . Cellular Signalling, 2001. **13**(2): p. 125-130.
148. Nishimune, H., et al., *Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway*. Nature cell biology, 2000. **2**(12): p. 906-914.
149. Romashkova, J.A. and S.S. Makarov, *NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 86-90.
150. Moresco, E.M.Y., D. LaVine, and B. Beutler, *Toll-like receptors*. Current Biology, 2011. **21**(13): p. R488-R493.

9. ANEXOS

	2	8	24	Diabético
Média	0,13	0,22	0,68	0,68
Desvio Padrão	0,07	0,06	0,08	0,08

Tabela 2. Índice de insulite verificado na linhagem NOD.

TLR2	NOD.Scid	2	8	24	Diabético
Média	0,04	0,03	0,09	0,02	0,03
DP	0,03	0,02	0,01	0,01	0,04
TLR4	NOD.Scid	2	8	24	Diabético
Média	0,02	0,04	0,09	0,08	0,02
DP	0,02	0,04	0,01	0,01	0,01

Tabela 3. Expressão gênica de TLR2 e TLR4 em ilhotas de camundongos NOD.

TLR5	NOD.Scid	2	8	24	Diabético
Média	0,03	0,02	0,06	0,08	0,01
DP	0,03	0,03	0,01	0,03	0,01
TLR6	NOD.Scid	2	8	24	Diabético
Média	0,08	0,07	0,13	0,24	0,05
DP	0,07	0,03	0,05	0,03	0,02

Tabela 4. Expressão gênica de TLR5 e TLR6 em ilhotas de camundongos NOD.

Reg1	NOD.Scid	2	8	24	Diabético
Média	6,87	21,59	0,13	0,60	32,74
DP	7,71	3,64	0,18	0,38	13,36
Reg2	NOD.Scid	2	8	24	Diabético
Média	276,36	347,03	1,25	5,96	33,28
DP	116,76	93,67	1,14	6,47	24,69

Tabela 5. Expressão gênica de Reg1 e Reg2 em ilhotas de camundongos NOD.

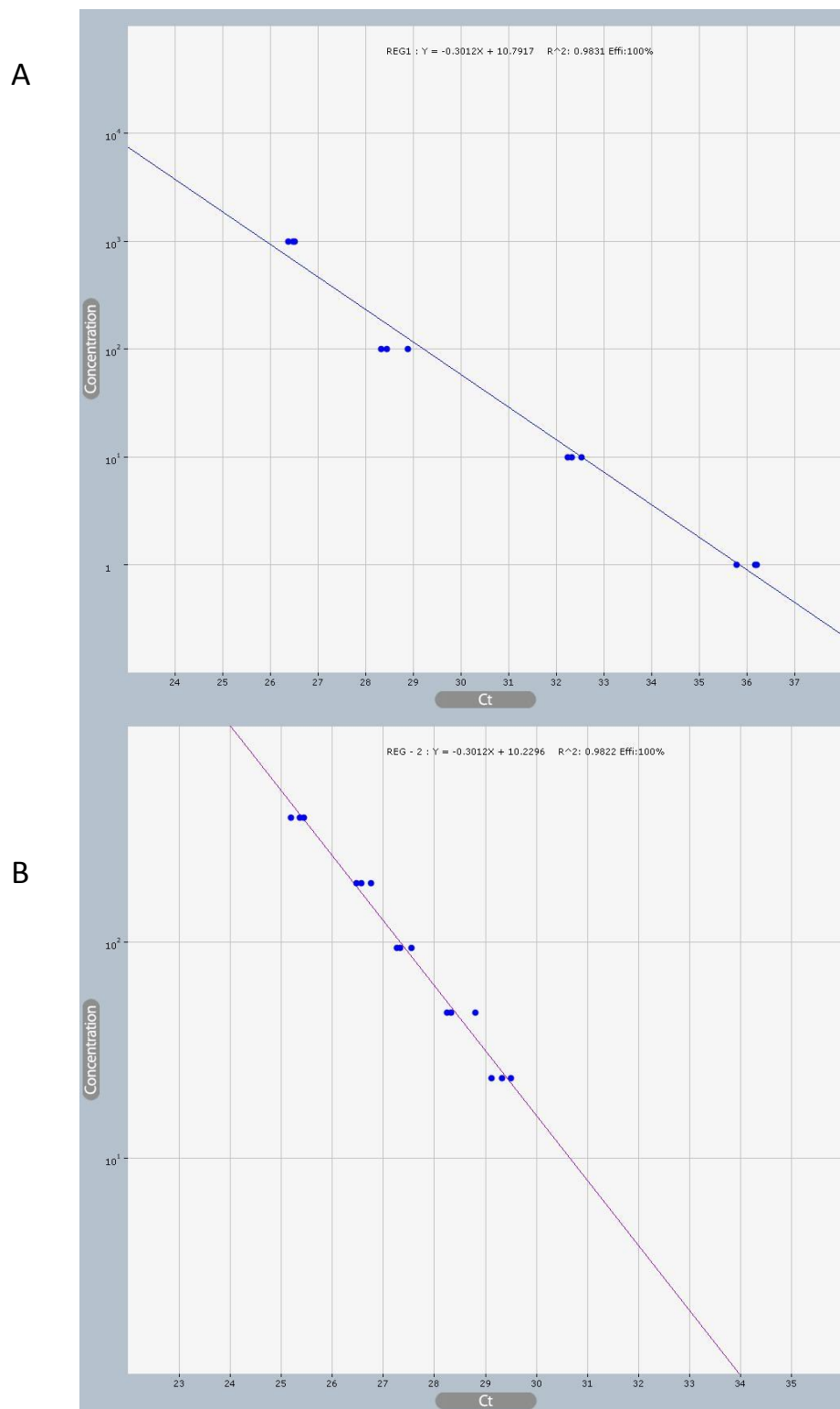
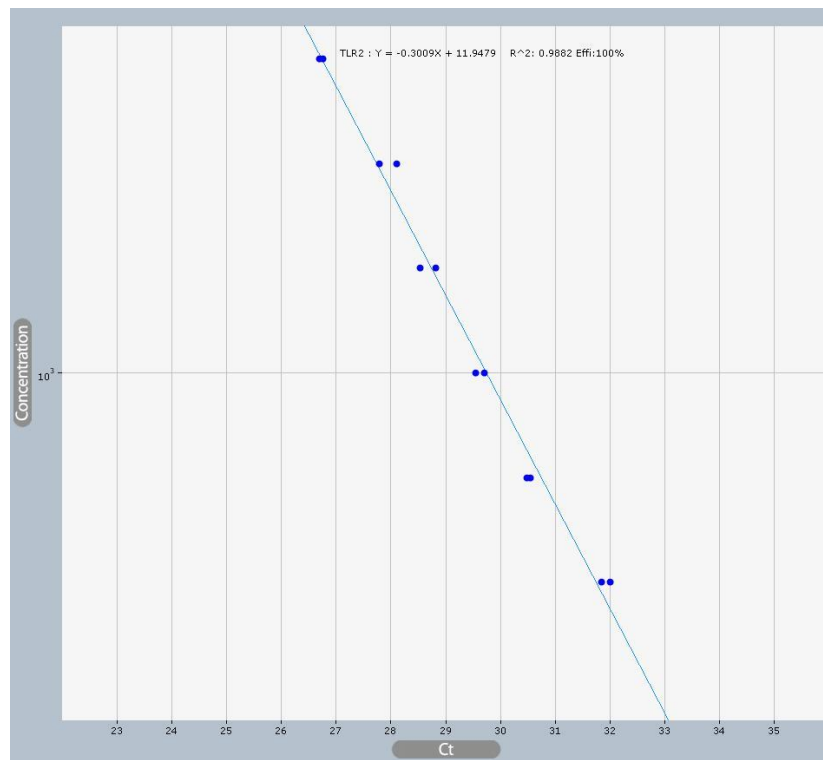


Figura 13. Curva de eficiência para os genes Reg1 (A) e Reg2 (B) em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD por RT-PCR em tempo real. Amostra de RNA total em diluições seriadas 4x e sistema de reação *One Step*. Análise empregando software Exicycler™ 96 analysis.

A



B

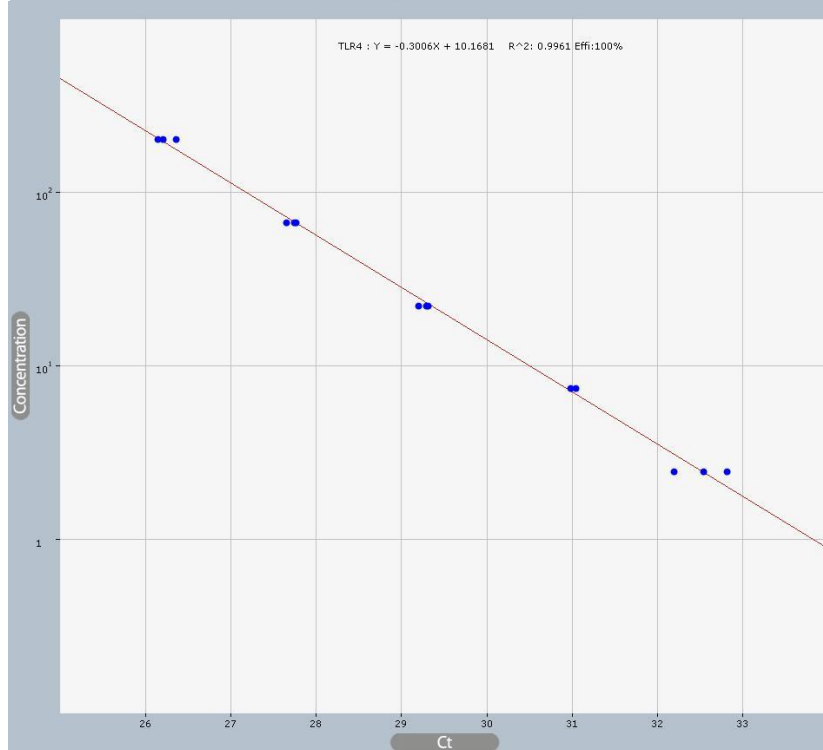


Figura 14. Curva de eficiência para os genes TLR2 (A) e TLR4 (B) em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD por RT-PCR em tempo real. Amostra de RNA total em diluições seriadas 4x e sistema de reação *One Step*. Análise empregando software Exicycler™ 96 analysis.

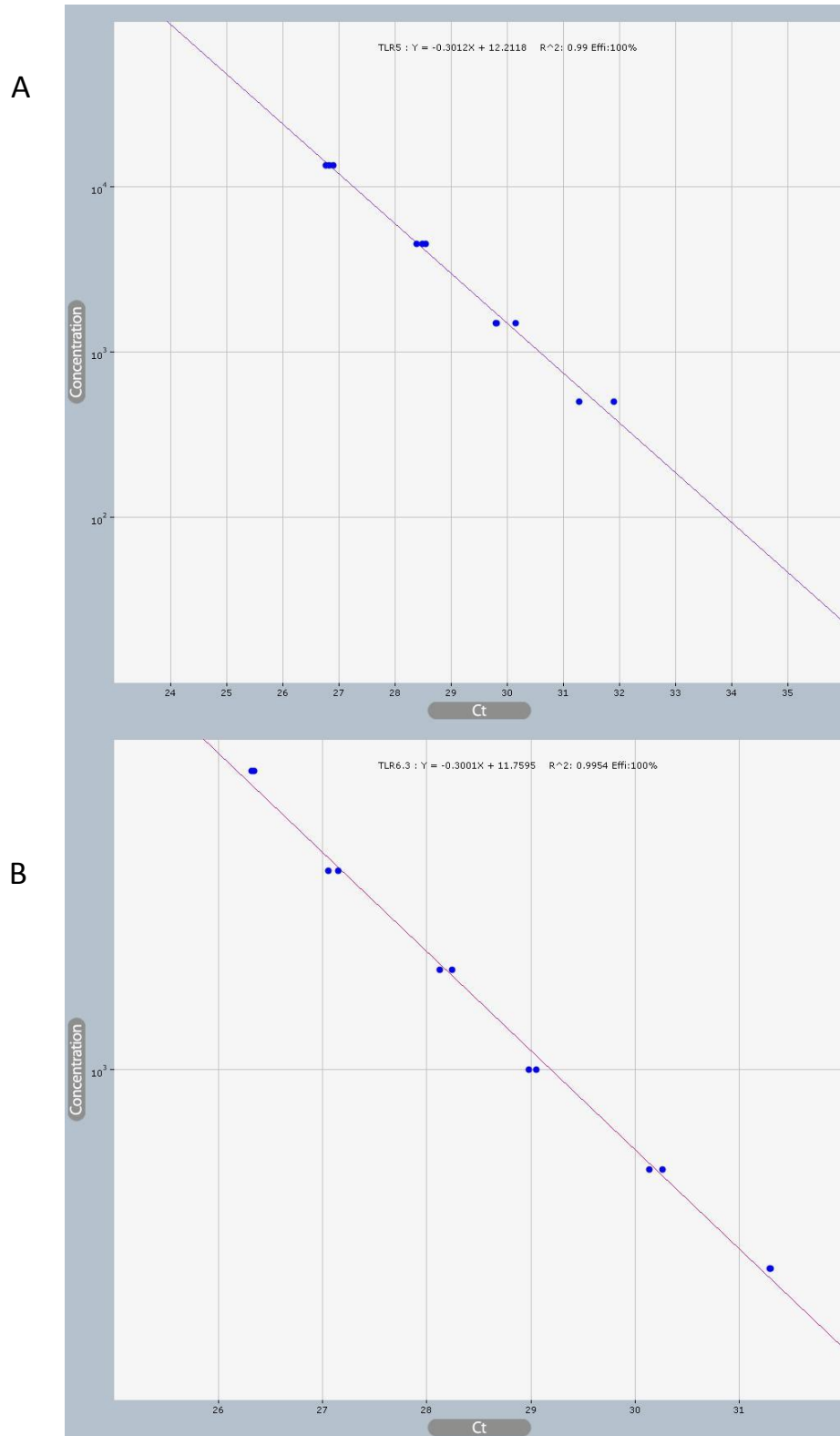


Figura 15. Curva de eficiência para os genes TLR5 (A) e TLR6 (B) em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD por RT-PCR em tempo real. Amostra de RNA total em diluições seriadas 4x e sistema de reação *One Step*. Análise empregando software Exicycler™ 96 analysis.

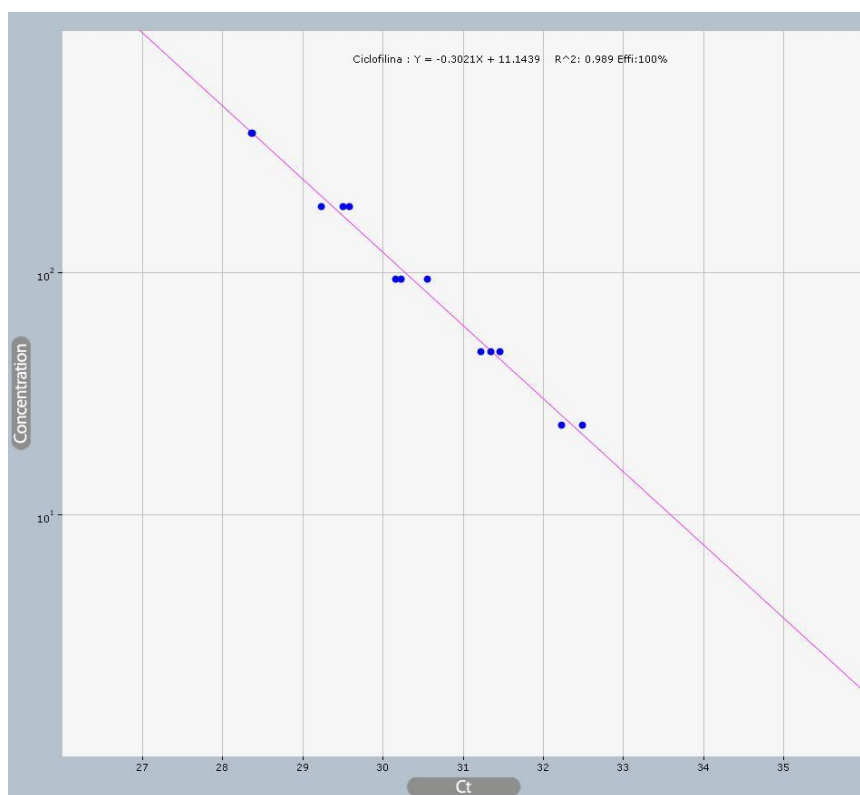


Figura 16. Curva de eficiência para o gene estrutural ciclofilina A em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD por RT-PCR em tempo real. Amostra de RNA total em diluições seriadas 4x e sistema de reação *One Step*. Análise empregando software Exicycler™ 96 analysis.