



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

NAYARA SIMON GONZALEZ SCHUMACHER CAVASSANI

MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DAS
FOLHAS DE *PASSIFLORA ALATA* SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS
DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS NON-OBESE DIABETIC (NOD)
SHILT/J SUBMETIDOS À CULTURA MISTA DE CÉLULAS MIN6 E LINFÓCITOS.

CAMPINAS

2023

NAYARA SIMON GONZALEZ SCHUMACHER CAVASSANI

MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DAS
FOLHAS DE *PASSIFLORA ALATA* SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS
DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS NON-OBESE DIABETIC (NOD)
SHILT/J SUBMETIDOS À CULTURA MISTA DE CÉLULAS MIN6 E LINFÓCITOS.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em Ciências na Área de Clínica Médica

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA NAYARA SIMON GONZALEZ SCHUMACHER CAVASSANI, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER.

CAMPINAS

2023

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

Sch86m Schumacher Cavassani, Nayara Simon Gonzalez, 1990-
Modulação da resposta inflamatória do extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata* sobre células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos Non-Obese Diabetic (NOD) ShiLt/J submetidos à cultura mista de células MIN6 e linfócitos / Nayara Simon Gonzalez Schumacher Cavassani.
– Campinas, SP : [s.n.], 2023.

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

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Células dendríticas. 3. *Passiflora alata*. 4. Camundongos NOD. I. Zollner, Ricardo de Lima, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Modulation of the inflammatory response of the aqueous extract of the leaves of *Passiflora alata* on dendritic cells derived from the bone marrow of Non-Obese Diabetic (NOD) ShiLt/J mice submitted to mixed culture of MIN6 cells and lymphocytes

Palavras-chave em inglês:

Type 1 diabetes mellitus

Dendritic cells

Passiflora alata

NOD mice

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Glaucia Maria Pastore

Mirian Akemi Furuie Hayashi

Julio Sérgio Marchini

Gabriel Forato Anhê

Data de defesa: 25-05-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0941-099X>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/9275004931577933>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

NAYARA SIMON GONZALEZ SCHUMACHER CAVASSANI

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER**
 - 2. PROFA. DRA. GLAUCIA MARIA PASTORE**
 - 3. PROFA. DRA. MIRIAN AKEMI FURUIE HAYASHI**
 - 4. PROF. DR. JULIO SÉRGIO MARCHINI**
 - 5. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ**
-

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 25/05/2023

Dedicatória

Aos meus amados pais, Tânia Cristina e Luis Fernando pelo companheirismo, paciência, amor, incentivo constante e compreensão incondicional à minha dedicação à pesquisa científica.

Ao meu esposo Neto pelo apoio, força, carinho e compreensão constantes ao longo desses anos.

A vocês eu devo tudo que sou! Amo vocês.

Meus agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades e permitir que eu seguisse pelo caminho que sempre sonhei.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, por todos os ensinamentos, apoio e valiosa orientação ao longo destes anos, e pela confiança em meu trabalho, sou eternamente grata à oportunidade que me deu em 2010 quando comecei meu estágio no laboratório e todo o percurso durante esses anos.

Ao meu grande amor Arthur que se tornou o anjo mais lindo, meu sobrinho e afilhado que estive com nossa família durante 3,5 anos (2018-2022). Muito obrigada por tudo que você fez e ainda continua fazendo por nossa família, a didinha te ama demais minha vida, por muitas vezes você que me dava o combustível para continuar a caminhada e não parar.

Aos meus queridos e amados pais Luis e Tânia, por abrirem a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que poderiam encontrar: o estudo.

Ao meu marido Neto, obrigada pelo companheirismo, paciência e compreensão. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma já não mais o fazia e obrigada por encher a minha vida de alegria, me apoiando em todas as etapas dessa jornada.
Ao seu lado, sou plenamente feliz e realizada.

Às minhas irmãs, sobrinhas e cunhados por todo carinho e incentivo. Enfim, toda minha família a qual amo muito, e sempre estiveram ao meu lado durante todo esse período.

Em especial também a minha amiga e irmã Virgínia que tenho eterna gratidão por toda ajuda e companheirismo durante esses anos. Às minhas amigas Daniella, Débora, Talita, Priscila e Patrícia pela ajuda em todos os momentos, pelo companheirismo absoluto, amizade e palavras de estímulo. À Senhora Margarida, minha segunda mãe, por toda ajuda, dedicação e companheirismo. Ao biólogo do laboratório, Prof. Dr. Luís Gustavo Romani Fernandes, pela colaboração no desenvolvimento do meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do projeto de pesquisa, processo: 2013- 25256-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bolsa processo nº140585/2015-4 e também ao CNPq pela concessão de verba para o projeto de pesquisa 448899/2015.

RESUMO

A linhagem de camundongos NOD (non-obese diabetic) é o modelo experimental mais utilizado para estudar o Diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) por desenvolver espontaneamente a doença semelhante à observada em humanos, tendo como característica marcante desse modelo a insulite, definida como infiltração de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas. Células dendríticas (DCs) e macrófagos são células apresentadoras de antígenos (APCs), presentes em grandes quantidades no pâncreas de camundongos NOD e desempenham papel importante na iniciação e progressão da resposta autoimune até o processo final onde ocorre a destruição das células beta pancreáticas. A expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), é um fator importante para a atividade tolerogênica das DCs, atuando no catabolismo do triptofano e produzindo metabólitos que suprimem os linfócitos T efetores e estimulam a diferenciação das células T reguladoras. No presente estudo investigamos os mecanismos *in vitro* pelos quais o tratamento com o extrato aquoso liofilizado das folhas de *Passiflora alata* (EALFPA) podem modular as células apresentadoras de antígenos derivadas da medula óssea (BM-APCs) e influenciar sua capacidade de polarizar linfócitos T. O modelo *in vitro* foi estabelecido utilizando culturas mistas de células apresentadoras de antígenos provenientes da medula óssea (BM-APCs) e linfócitos T de camundongos NOD, juntamente com células MIN6 (linhagem de células beta produtoras de insulina) sob estresse como fonte de antígenos de células β pancreáticas. Mostramos que a concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ com EALFPA reduziu a proliferação de linfócitos T efetores CD4 e CD8 em camundongos diabéticos, mas não em camundongos não diabéticos, e diminuiu a liberação de citocinas IL-6 e IFN- γ nos sobrenadantes das culturas celulares. Além disso, observamos o aumento de linfócitos T reguladores (Tregs) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ de camundongos diabéticos. Esses resultados podem ser parcialmente explicados pelos efeitos do EALFPA em BM-APCs, onde regulam negativamente a expressão da molécula coestimuladora CD86 e aumentam a expressão de IDO-1 em F4/80⁺ BM-APCs. Os resultados apresentados nos permite um melhor entendimento das propriedades imunomoduladoras dos polifenóis presentes nas folhas de *P. alata*, ou seja, sugerem indução das células apresentadoras de antígenos tolerogênicas com polarização para um perfil de Treg diminuindo a atividade dos linfócitos T efetores CD4⁺ e CD8⁺, contribuindo assim para a melhor compreensão de seus efeitos antiinflamatórios e com a possível translacionalidade para protocolos clínicos e interferência na evolução do diabetes autoimune.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 1, Células dendríticas, *Passiflora alata* e camundongos NOD.

ABSTRACT

The strain of NOD (non-obese diabetic) mice is the most used experimental model to study Type 1 Diabetes Mellitus (DM-1) because it spontaneously develops a disease similar to that observed in humans, with insulinitis as a striking feature of this model, defined as infiltration of inflammatory cells into the pancreatic islets. Dendritic cells (DCs) and macrophages are antigen-presenting cells (APCs), present in large amounts in the pancreas of NOD mice and play an important role in the initiation and progression of the autoimmune response to the final process where the destruction of pancreatic beta cells occurs. The expression of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), is an important factor for the tolerogenic activity of DCs, acting in the catabolism of tryptophan and producing metabolites that suppress effector T lymphocytes and stimulate the differentiation of regulatory T cells. In the present study, we investigated the *in vitro* mechanisms by which treatment with lyophilized aqueous extract of *Passiflora alata* leaves (LAEPAL) can modulate bone marrow-derived antigen-presenting cells (BM-APCs) and influence their ability to polarize T lymphocytes. The *in vitro* model was established using mixed cultures of bone marrow antigen-presenting cells (BM-APCs) and T lymphocytes from NOD mice, together with MIN6 cells (insulin-producing beta cell line) under stress as a source of pancreatic β cells antigens. We showed that the concentration of 300 $\mu\text{g/mL}$ with LAEPAL reduced the proliferation of CD4 and CD8 effector T lymphocytes in diabetic mice but not in non-diabetic mice and decreased the release of IL-6 and IFN- γ cytokines in cell culture supernatants. Furthermore, we observed increased regulatory T lymphocytes (Tregs) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ in diabetic mice. These results can be partially explained by the effects of LAEPAL on BM-APCs, where it downregulates the expression of the costimulatory molecule CD86 and increases the expression of IDO-1 in F4/80⁺ BM-APCs. The results presented allow us a better understanding of the immunomodulatory properties of polyphenols present in *P. alata* leaves; that is, they suggest induction of tolerogenic antigen-presenting cells with polarization towards a Treg profile, decreasing the activity of effector T lymphocytes CD4⁺ and CD8⁺, thus contributing to a better understanding of its anti-inflammatory effects and with the possible translation into clinical protocols and interference in the evolution of autoimmune diabetes.

Keywords: Type 1 diabetes mellitus, Dendritic cells, *Passiflora alata* and NOD mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Compostos fenólicos identificados nas folhas de <i>Passiflora alata</i> pela técnica HPLC, vitexina, isoorientina, catequina e rutina.....	31
Figura 2: A) Folhas do maracujá doce (<i>Passiflora alata</i> Curtis). B) Folhas de <i>Passiflora alata</i> secas e trituradas em estufa.....	32
Figura 3: Preparo do Extrato Aquoso Liofilizado das folhas de <i>P. alata</i>	34
Figura 4: Fluxograma do tratamento <i>in vitro</i> dos camundongos NOD diabéticos e não diabéticos.....	35
Figura 5: Figuras representativas do procedimento de extração de medula óssea de camundongos NOD. Etapas 1 e 2: Incisão do camundongo e retirada dos fêmures e tíbias. Etapas 3 e 4: Lavagem dos ossos e retirada a medula óssea. Etapa 5: Suspensão de células da medula óssea e posteriormente levadas a cultura para diferenciação com a citocina GM-CSF durante 7 dias.....	36
Figura 6: Imagem representativa do procedimento de manutenção das células MIN6 sob estresse celular com meio com concentração alta de glicose (100 mM) durante 24 horas.....	37
Figura 7: Imagem representativa da extração de linfócitos dos camundongos NOD diabéticos e não diabéticos por adesão celular em coluna de lã de nylon. Etapa 1: Extração do baço. Etapas 2 e 3: Baço sendo macerado e suspensão celular sendo homogeneizada. Etapa 4: Preparo e filtração da solução ACK. Etapa 5: Suspensão celular com lise de hemácias. Etapa 6: Incubação das células em lã de nylon. Etapa 7: contagem de linfócitos em câmara de Neubauer.....	38
Figura 8: Imagens representativas para o preparo de cultura mista. Etapa 1: Preparação do extrato aquoso liofilizado. Etapa 2: extração e diferenciação da	

medula óssea por 7 dias em células dendríticas. Passo 3: Células MIN6 sob estresse celular por 24 horas. Passo 4: Extração de linfócitos retirados do baço dos camundongos através da coluna de lã de nylon. E Etapa 5: Incubação por 96 horas de células dendríticas, células MIN6, linfócitos e as concentrações de extrato aquoso liofilizado de *Passiflora alata*..... 40

Figura 9: Placas representativa do tratamento *in vitro* das culturas celulares mistas com células dendríticas, MIN6, e linfócito T. Segue a classificação dos grupos: C+ (controle celular proliferativo com 5 µg/mL de (ConA)). NT (cultura não tratada). E os demais poços as concentrações de EALFPA 100, 200, 300 e 500 µg/mL. (A) Placa para viabilidade celular. (B) Placa para Proliferação de linfócitos T e marcadores de BM-APCs. (C) Placa de Linfócito T regulador e dosagem de citocinas..... 42

Figura 10: Imagens representativas das culturas celulares das populações selecionadas com base no tamanho (FSC- Forward Scatter – Painel A) e complexidade interna (SSC-Side Scatter – Painel B). No painel B é possível separar as populações viáveis e mortas. No quadrante C dentre as células viáveis selecionadas era possível separar populações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. E no quadrante D as mesmas populações de CD4⁺ e CD8⁺ que estão em proliferação..... 44

Figura 11: Imagens representativas das populações selecionadas com base no FSC (Painel A) e SSC (Painel B). No painel B é possível separar as populações viáveis e mortas. No quadrante C dentre as células viáveis selecionadas foi possível separar populações de CD4⁺ e no quadrante D, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3..... 45

Figura 12: Imagens representativas das populações selecionadas com base no FSC (Painel A) e SSC (Painel B). No painel B é possível separar as populações viáveis e mortas. No quadrante C dentre as células viáveis selecionadas foi possível separar populações de CD4⁺ e no quadrante D as mesmas populações de CD4⁺ e IL-2⁺..... 46

Figura 13: Imagens representativas das populações selecionadas com base no FSC (Painel A) e SSC (Painel B). No painel B é possível separar as

populações viáveis e mortas e selecionar a população de interesse F4/80. No quadrante selecionar dentro de F4/80 a população de CD86⁺ e no quadrante D a IDO⁺..... 47

Figura 14: Imagem representativa da quantificação das citocinas realizada pelo kit Legendplex Mouse Inflammation Panel..... 49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Frequência cumulativa sobre a incidência do diabetes nos camundongos NOD ShiLt/J. Observa-se que 80,8% dos animais ficaram diabéticos ao longo das 30 semanas de vida..... **51**

Gráfico 2: Gráfico representativo da frequência (%) de células mortas (barras cinzas) e células viáveis (barras brancas) em culturas mistas de camundongos NOD diabéticos. * $p < 0,05$ ($n=15$). Análise estatística de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn..... **52**

Gráfico 3: Proliferação de células T CD4⁺ em culturas mistas (linfócitos, BM-APC e células MIN6 sob estresse) tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média $\pm$ EPM de CD4⁺CFSElow (população em proliferação de linfócitos T CD4⁺) de camundongos NOD diabéticos (A) e não diabéticos (C). As barras pretas representam as culturas submetidas ao mitógeno Concanavalina A (ConA: controle +), as barras brancas representam as culturas sem tratamento (NT), as barras cinzas são culturas tratadas com 100, 200 e 300 μ g/mL de EALFPA nos camundongos diabéticos, e a barra cinza nos camundongos não diabéticos tratada com 300 μ g/mL de EALFPA. Alinha tracejada horizontal representa níveis basais de proliferação de linfócitos T não estimuladas. Os painéis B e D são gráficos de pontos mostrando o CFSEhigh (superior direito, linfócitos T CD4⁺ não proliferativas) e CFSElow (superior esquerdo, T CD4⁺ proliferativas) de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos, respectivamente. * $p < 0,05$ ($n=15$) em comparação com o grupo NT. Para a análise estatística utilizamos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn..... **54**

Gráfico 4: Proliferação de linfócitos T CD8 em culturas mistas (linfócitos, BM-APC e células MIN6 sob estresse) tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média $\pm$ EPM de CD4⁺CFSElow (população em proliferação de linfócitos T CD8⁺) de camundongos NOD diabéticos (A) e não diabéticos (C). As barras pretas representam as culturas submetidas ao mitógeno Concanavalina A (ConA: controle +), as barras brancas representam as culturas sem tratamento (NT), as barras cinzas são culturas tratadas com 100, 200 e 300 μ g/mL de EALFPA nos camundongos diabéticos, e a barra cinza nos camundongos não

diabéticos tratada com 300 µg/mL de EALFPA. A linha tracejada horizontal representa níveis basais de proliferação de células T não estimuladas. Os painéis B e D são gráficos de pontos mostrando o CFSE_{high} (superior direito, linfócitos T CD8⁺ não proliferativas) e CFSE_{low} (superior esquerdo, T CD4⁺ proliferativas) de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos, respectivamente. *p< 0,05 (n=15) em comparação com o grupo NT. Para a análise estatística utilizamos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.....

56

Gráfico 5: Detecção de IL-2 intracelular em linfócitos T CD4⁺ em culturas mistas (linfócitos T e células MIN6, estimuladas (+) ou não com BM-APCs (-), e tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média±EPM da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ que produzem citocina IL-2 não estimuladas (A) ou estimuladas (C) com BM-APCs. As culturas mistas, tratadas com 300 µg/mL de EALFPA (barras cinzas), foram comparadas com culturas não tratadas (NT – barras brancas). Os painéis B e D são gráficos de pontos representativos mostrando células T CD4⁺ IL-2⁺ (canto superior direito). ***p<0,0001 (n=15). Para a análise estatística utilizamos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn

58

Gráfico 6: Detecção de IL-2 intracelular em linfócitos T CD8 em culturas mistas (linfócitos T e células MIN6, estimuladas (+) ou não com BM-APCs (-), e tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média±EPM da porcentagem de linfócitos T CD8 que produzem citocina IL-2 não estimuladas (A) ou estimuladas (C) com BM-APCs. As culturas mistas, tratadas com 300 µg/mL de EALFPA (barras cinzas), foram comparadas com culturas não tratadas (NT, barras brancas). Os painéis B e D são gráficos de pontos representativos mostrando células T CD8⁺ IL-2⁺ (canto superior direito). ***p<0,0001 (n=15). Para a análise estatística utilizamos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.....

59

Gráfico 7: Quantificação de citocinas em sobrenadantes de culturas celulares mistas de linfócitos T de camundongos NOD e células MIN6 sob estresse, estimuladas (+) ou não estimuladas (-) com BM-APCs e tratadas com EALFPA. Os painéis representam a média±EPM das concentrações das citocinas: IL-6 (A e B), TNF-α (C e D), IFN-γ (E e F), IL-17A (G e H) e IL -10 (I e J) em sobrenadantes de culturas celulares de culturas celulares mistas não estimuladas (BM-APCs, barras esquerdas) ou estimuladas (BM-APCs, barras

direitas) tratadas com 300 µg/mL de EALFPA (barras cinzas) e no grupo controle (barras brancas). ****p<0,0001, *p<0,05 (n=15). Para este ensaio utilizamos a análise estatística com o Teste de Mann Whitney.....

61

Gráfico 8: Frequência de CD25⁺Foxp3⁺ Tregs em linfócitos T CD4⁺ de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos em culturas celulares mistas compostas por linfócitos T, BM-APCs e células MIN6 sob estresse tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média±EPM das porcentagens de CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs em cultura celular mistas com linfócitos T de camundongos NOD diabéticos (A) ou não diabéticos (C), tratados com 300 µg/mL de EALFPA (barras cinzas) ou não tratados (barras pretas). Os painéis B e D são gráficos de pontos representativos mostrando porcentagens de Tregs CD25⁺Foxp3⁺ (quadrante superior direito) na população de linfócitos T CD4⁺. ****p<0,0001 (n=15). Para este ensaio utilizamos a análise estatística Teste de Mann Whitney.....

62

Gráfico 9: Expressão de CD86 e IDO-1 em F4/80⁺ BM-APCs tratadas *in vitro* com EALFPA. Os painéis A e B representam a média±EPM da mediana da intensidade de fluorescência do fluorocromo conjugado com anticorpos monoclonais direcionados à molécula coestimuladora CD86 (A) e enzima IDO-1 (B) em F4/80⁺ BM-APCs tratados (barras cinzas) ou não tratados (barras pretas) com 100, 200 e 300 µg/mL de EALFPA. *p<0,05; **p<0,01 (n=15), em comparação com o grupo NT. Para este ensaio utilizamos a análise estatística de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.....

64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK - Cloreto-Potássio e Amônio
APCs - Células apresentadoras de antígeno
BM-APCs - Células apresentadoras de antígeno provenientes da medula óssea
CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CFSE - Succinimidil ester de carboxifluoresceína - Sonda de proliferação - cell-dye
ConA - Concanavalina A
DCs - Células dendríticas
DM-1 - Diabetes Mellitus tipo 1 A
DMEM - Dulbecco's modified Eagle's médium
EALFPA - Extrato Aquoso Liofilizado das Folhas de *Passiflora alata*
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimático
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
EROs - Espécies reativas de oxigênio
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FSC - Forward Scatter
GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL-1B - Interleucina-1B
IL-2 - Interleucina 2
IL-4 - Interleucina 4
IL-5 - Interleucina 5
IFN - Interferon
LIT - Laboratório de Imunologia Translacional
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MIN6 - Células beta linhagem de insulinoma de murinho
NFkB - Fator de transcrição NF-kappa beta
NK - Natural Killer
NO - Óxido nítrico
NOD-Shilt-J – camundongo diabético não obeso
P. alata - *Passiflora alata* Curtis
PBS - tampão fosfato-salino
PE - Ficoeritrina
Percp - Proteínas Peridina-Chropila

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SFB - Soro fetal bovino

SPF - (Specific Pathogens Free) Livre de patógenos comuns

SSC - Side Scatter

TH1 - Células T helper 1

TH2 - Células T helper 2

TNF - Fator de necrose tumoral

TRF - Triptofano

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
Hipótese de Trabalho.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1. Diabetes Mellitus tipo 1 A.....	25
3.2. Camundongos NOD (<i>non-obese diabetic</i>).....	25
3.3. Papel das células dendríticas na progressão do Diabetes.....	26
3.4. Células MIN6.....	28
3.5. Estresse oxidativo e Compostos Antioxidantes.....	29
3.6 Antioxidantes presentes no <i>Passiflora alata</i> Curtis.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Processamento das folhas de <i>Passiflora alata</i> Curtis.....	32
4.2. Preparo das soluções e meios de culturas utilizados.....	32
4.2.1. Solução para lavagem da medula óssea.....	32
4.2.2. PBS e EDTA 10 mM.....	32
4.2.3. Meio DMEM 11 mM e DMEM 25 mM completo.....	33
4.2.4. Meio de cultura RPMI 1640 completo.....	33
4.2.5. Meio de congelamento.....	33
4.2.6. Tripsina com Hanks.....	33
4.3. Preparo do extrato aquoso liofilizado das folhas de <i>Passiflora alata</i> (EALFPA) para tratamento <i>in vitro</i>	33
4.4. Modelos Experimentais e Sacrifício dos animais.....	34
4.5. Diferenciação <i>in vitro</i> de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos NOD diabéticos.....	36
4.6. Manutenção e cultivo das Células MIN6.....	37
4.7. Extração de linfócitos para os ensaios de cultura mista.....	37
4.8. Preparo da cultura mista (DCs, MIN6 e linfócitos T) de camundongos NOD.....	39
4.9. Proliferação de linfócitos.....	43
4.10. Avaliação Tregs e IL-2.....	44
4.11. Avaliação dos marcadores celulares de DCs tolerogênicas na presença de células MIN6.....	46

4.12 Análise de Citometria de fluxo.....	48
4.13. Quantificação das citocinas.....	48
4.14. Análise Estatística.....	50
4.15. Formatação do texto.....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1 Incidência do Diabetes.....	51
5.2. O EALFPA inibe a proliferação de células T de camundongos NOD diabéticos, mas não afeta a proliferação de IL-2.....	51
5.3. Modulação de citocinas em culturas celulares mistas de linfócitos T de camundongos NOD com BM-APC e células MIN6 tratadas com EALFPA.....	60
5.4. EALFPA induz Tregs CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ em culturas mistas de linfócitos T de camundongos NOD com BM-APC e células MIN6 sob estresse.....	62
5.5. O EALFPA modula a expressão da molécula coestimuladora CD86 e da enzima IDO-1 <i>in vitro</i> em F4/80 ⁺ de culturas celulares compostas por BM-APC.....	63
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÃO.....	72
8. REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO I – Comissão de Ética no Uso de Animais.....	79
ANEXO II – Comissão de Ética no Uso de Animais – Aditivo.....	80
ANEXO III – Artigo publicado na revista Cytokine.....	81

1.INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) autoimune é uma doença endócrina no qual o metabolismo de glicose se altera devido a deficiência de insulina decorrente de um ataque autoimune às células beta pancreáticas responsáveis por sua produção e liberação (1, 2). Vários mecanismos são propostos para explicar a quebra da tolerância imunológica no DM-1, incluindo a predisposição genética e fatores ambientais, os quais favorecem o desencadeamento de mecanismos autoimunes (3). A hiperglicemia crônica induzida pela sobrecarga de glicose leva ao processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que comprometem a função das células beta pancreáticas, resultando na disfunção da sua atividade secretora (4).

A linhagem de camundongos NOD (non-obese diabetic) ShiLt/J é modelo experimental de animais predispostos a desenvolver o diabetes autoimune espontâneo, amplamente usado para estudar a imunopatologia do diabetes tipo 1, com similaridade à doença humana. Apresenta incidência da doença entre 70-100% nas fêmeas, e 40-60% nos machos, até a 30ª semana de vida (5-8).

As células dendríticas (DCs) presentes no pâncreas destes camundongos captam antígenos derivados de células β pancreáticas, migram para os linfonodos e ativam linfócitos T CD4 e CD8 específicos de ilhotas não ativadas. Dependendo dos sinais entregues à linfócito T pelas DCs, as células T se diferenciam em células efetoras inflamatórias, como linfócitos T auxiliares (Th1), anti-inflamatórias (Th2) ou células reguladoras (Treg). Os linfócitos T específicos de ilhotas ativadas migram para o pâncreas, onde se infiltram e se acumulam ao redor das ilhotas. Os primeiros infiltrados parecem ser dominados por células Th2 e Treg; mecanismo chamado o de periinsulite, pois há pouca invasão nas ilhotas. Em algum momento, o infiltrado se torna invasivo e começa a entrar e destruir as células β pancreáticas, e o equilíbrio entre as populações de linfócitos T reguladoras e inflamatórias é perdido. Os fatores precisos que desencadeiam tanto a perda da auto tolerância quanto o desenvolvimento da insulite invasiva não são bem consolidados e compreendidos (9). As DCs desempenham papéis importantes em todos os estágios da resposta autoimune no DM1 devido ao seu papel fundamental na ativação de linfócitos T não ativados e na manutenção da autotolerância (10). Sendo assim, as DCs podem participar da regulação do DM1, por ser um distúrbio relacionado a ação dos linfócitos T autorreativos contra as células β pancreáticas (11).

A regulação das DCs na morfogênese dos linfócitos T é essencial para a manutenção da homeostase imunológica. No entanto, na presença de linfócitos T autorreativos, a apresentação de DCs de autoantígenos de células β pode estimular a

ativação desses linfócitos T e interromper o equilíbrio entre estimulação imunológica e imunossupressão. O desequilíbrio resultante pode levar à inflamação crônica, que pode evoluir para DM-1 (12).

Quando o ambiente celular fornece sinais tolerogênicos, as DCs falham em induzir a proliferação de linfócitos T e então tendem a induzir a tolerância. As DCs mostraram guiar a diferenciação de linfócitos T autorreativos em células efectoras pró-inflamatórias capazes de interromper a biossíntese de insulina das ilhotas, induzindo a morte de células β (13, 14). A morte de células β durante a progressão da insulite é provavelmente desencadeada pela estimulação de DCs ativadas da diferenciação de linfócitos Th0 autorreativos *naïves* em linfócitos T efectoras que produzem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de radicais livres (15).

O mecanismo de tolerância mediado por DCs pode ocorrer por meio da privação de aminoácidos essenciais por depleção dos níveis celulares de triptofano, produção de quinureninas que são conhecidas por serem tóxicas para os linfócitos T pró-inflamatórias e indução de linfócitos T reguladores (11, 16).

Uma vez que as células apresentadoras de antígenos (APCs), como DCs e macrófagos, desempenham papel fundamental na ativação da resposta de linfócitos T (11, 17), elas se tornam um alvo potencial para intervenções imunomoduladoras com fármacos (18, 19), anticorpos monoclonais (20) e produtos naturais derivados de plantas como polifenóis (19, 21, 22).

Os linfócitos desempenham papel central no dano das ilhotas pancreáticas. Linfócitos T CD4⁺ produzem citocinas que ativam a proliferação e diferenciação de linfócitos T efetores específicos. Por outro lado, linfócitos T CD8⁺ com função citotóxica, liberam perforinas e grânulos de granzimas induzindo a apoptose por meio da interação Fas/Fas L (5, 7). No presente estudo investigamos mecanismos imunomoduladores no processo de regulação de linfócitos T específicos.

Em estudos prévios mostramos a diminuição do processo inflamatório nas células β das ilhotas pancreáticas (insulite) tanto *in vitro* quanto *in vivo*, onde camundongos NOD foram submetidos ao tratamento crônico por via oral com extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata*, indicando a importância de polifenóis presentes neste extrato devido as suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antiproliferativas (23, 24).

Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais o extrato aquoso atua na proteção dessas ilhotas. Durante o diabetes tipo 1, células do sistema imune invadem as ilhotas pancreáticas levando a destruição das células β . A diminuição do número de células do infiltrado celular nas ilhotas dos animais tratados pode ter ocorrido devido a fatores como a migração e a proliferação de células do sistema imune. Assim a partir destas considerações, a proposição deste trabalho é investigar os mecanismos imunomoduladores e

imunorreguladores pelos quais o tratamento com o extrato aquoso liofilizado das folhas de *Passiflora alata* (EALFPA) possam atuar modulando as DCs derivadas da medula óssea de camundongos NOD, consequentemente interferindo no processo de regulação de linfócitos T específicos e na expressão da enzima IDO, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos que poderiam prevenir a evolução do diabetes autoimune.

Hipótese de Trabalho: Compostos fenólicos presentes nas folhas do extrato aquoso liofilizado de *Passiflora alata* Curtis modulam a resposta inflamatória sobre as células dendríticas tolerogênicas derivadas da medula óssea de camundongos NOD interferindo na regulação de linfócitos T e consequentemente na expressão do DM1.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral: Avaliar em culturas celulares *in vitro* os efeitos do tratamento com o extrato aquoso liofilizado das folhas de *Passiflora alata* em células dendríticas (originadas a partir de células precursoras obtidas da medula óssea de camundongos NOD) na presença de células MIN6 e linfócitos T.

2.2. Objetivos Específicos:

- Nas culturas mistas acima descritas (BM-APCs, MIN6 e linfócitos), avaliar a:
 - Proliferação de linfócitos viáveis TCD4⁺ e TCD8⁺, com a utilização da sonda CFSE em ensaios de citometria de fluxo;
 - Capacidade da DC modular populações efetoras de linfócitos T provenientes nos grupos experimentais, considerando como antígenos as células MIN6; em ensaios de culturas mistas.
 - Liberação das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-10 nos sobrenadantes de culturas mistas.
 - A expressão da molécula co-estimuladora CD86, bem como da enzima IDO na diferenciação celular, submetidas ou não ao tratamento de EALFPA nas doses de 100,200 e 300 $\mu\text{g/mL}$ em população positiva para o marcador F4/80⁺.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Diabetes Mellitus tipo 1 A

O diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) é uma doença autoimune crônica e representa 5 a 10% dos casos de diabetes, é um distúrbio endócrino no qual o metabolismo de glicose é alterado devido a deficiência de insulina após a destruição das células β pancreáticas responsáveis por sua produção e liberação, levando ao aumento dos níveis de glicose no sangue (hiperglicemia) (13, 25). Vários mecanismos têm sido propostos para quebrar a tolerância imunológica no DM-1, como a predisposição genética do indivíduo e fatores ambientais, os quais parecem favorecer o desencadeamento de mecanismos autoimunes (3). A investigação da fisiopatologia do diabetes em humanos é limitada e por essa razão é comum o uso de modelos experimentais, como os camundongos *non-obese diabetic* (NOD), geneticamente predispostos ao desenvolvimento dessa doença.

3.2. Camundongos NOD (*non-obese diabetic*)

Os camundongos NOD representam um modelo experimental de DM-1, por desenvolver espontaneamente a doença similar ao observado em humanos. No Brasil a primeira colônia de camundongos NOD foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) por Pavin & Zollner (1994) a partir de colônias matrizes provenientes do laboratório INSERM U-25-Necker, Paris, França (26). Atualmente a linhagem de camundongos NOD foi reimplantada e mantida no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp definidas como NOD ShiLt/J a partir de matrizes adquiridas do Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME EUA). As colônias matrizes são mantidas em condições germ-free no CEMIB e as proles são utilizadas nos experimentos no biotério do Laboratório de Imunologia Translacional (LIT), onde são mantidas em micro isoladores em condições livre de patógenos (SPF). A incidência de diabetes nessa linhagem é de 70-100% nas fêmeas e 40-60% nos machos, os quais desenvolvem espontaneamente o DM-1 até a 30ª semana de vida (6).

A fisiopatologia do diabetes autoimune na linhagem NOD possui duas fases, a pré-diabética caracterizada pela infiltração de linfócitos nas ilhotas pancreáticas e a segunda fase com a destruição das células beta pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina e consequente hiperglicemia. As células mononucleares encontradas nesses períodos incluem linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, células dendríticas, células NK, linfócitos B e CD11c⁺, as quais progridem e invadem as ilhotas pancreáticas. Os fatores ambientais, tais como

condições de habitação, saúde e dieta podem influenciar também no desenvolvimento do diabetes nesses animais (5, 7, 8). Os linfócitos TCD4⁺ produzem citocinas que atuam na proliferação e diferenciação de linfócitos T e macrófagos, enquanto os linfócitos TCD8⁺ exercem função citotóxica, onde atuam na liberação de grânulos de perforinas e granzimas e também induzem a apoptose pela interação Fas/Fas L (5, 6).

3.3. Papel das células dendríticas na progressão do Diabetes

As DCs constituem uma população heterogênea de células apresentadoras de antígenos (APCs) que estão presentes em quase todos os tecidos. Desempenham importante papel na regulação da resposta imunológica, são precursoras da medula óssea que deslocam dos vasos sanguíneos para os tecidos periféricos, onde estão presentes em diferentes fases de desenvolvimento, ativação e maturação (27). Devido ao seu papel, elas são cruciais em todos os estágios da resposta autoimune em DM-1 devido ao seu papel fundamental na ativação de linfócitos *T* não ativados e na manutenção da auto tolerância (9).

As DCs e macrófagos estão presentes em números elevados no pâncreas de camundongos NOD, onde desempenham papel importante na inicialização e progressão da resposta autoimune até o processo final onde ocorre a destruição das células β pancreáticas (28). Elas absorvem antígenos liberados derivados de células β e migram para os linfonodos drenantes e ativam linfócitos TCD4 e TCD8 específicos para as ilhotas. Dependendo dos sinais entregues aos linfócitos T através das DCs, os linfócitos T se diferenciam em células efetoras inflamatórias (como auxiliar Th1, Th2 ou células reguladoras (Treg). Os linfócitos T específicos nas ilhotas ativadas migram para o pâncreas, onde se infiltram e se acumulam ao redor das ilhotas. Os primeiros infiltrados parecem ser dominados pelos linfócitos Th2 e Treg; isto é denominado periinsulite, pois há pouca invasão celular caracterizada ao redor da ilhota. Em determinado momento, o infiltrado inflamatório se torna invasivo e invade e destrói as células β . Assim, o equilíbrio entre os níveis de linfócitos T reguladores (Treg) e populações de células inflamatórias é perdido. Os fatores precisos que desencadeiam a perda de autotolerância e desenvolvimento de insulite invasiva não são bem compreendidos (9).

Banchereau e Steinman, 1998 (17) demonstraram que na periferia as DCs imaturas captam antígenos e recebem sinais por meio de receptores de superfície, tornando-se ativadas e capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T inativados em células efetoras. No entanto, essas DCs podem não contribuir para a estimulação adequada dos linfócitos Treg, contribuindo assim para uma falha no controle do processo autodestrutivo no órgão alvo (17).

As funções das células dendríticas são mediadas pela interação de linfócitos T e pela produção de citocinas; elas apresentam-se diminuídas na expressão da co-estimulação (CD80, CD86 e CD40) e moléculas de MHC classe II, bem como baixa capacidade de induzir

a proliferação de linfócitos T CD8⁺ diabetogênicos, em contraste com as DCs imunogênicas totalmente maduras (29).

Um fator importante para a atividade tolerogênica das DCs é a expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), a qual atua no catabolismo do triptofano gerando uma série de metabólitos conhecidos coletivamente como quinureninas, sendo que estes, atuam inibindo a proliferação e ativação de linfócitos T, promovendo a apoptose ou diferenciação dos linfócitos T para um perfil regulador (30, 31).

A expressão da enzima IDO é aumentada pela estimulação de DCs com TGF- β (32, 33). Todavia Pallota *et al.*, 2014 (32) demonstraram que a atividade de sinalização de IDO é desencadeada em células dendríticas plasmocitóides (pDCs) pela transformação do fator de crescimento β (TGF- β), um evento que requer a via não canônica NF- κ B e induz a expressão de IDO de longa duração e a produção autócrina de TGF- β , sustentando assim um fenótipo regulatório estável em pDCs. A expressão de IDO e a função catalítica são defeituosas em pDCs de camundongos NOD, e relataram que o TGF- β falhou em ativar a função de sinalização de IDO, bem como regular a expressão de IDO em pDCs de camundongos NOD. Viram também que a superexpressão de IDO em pDCs de camundongos NOD tratados com TGF- β também resultou na capacidade de pDC de suprimir a apresentação *in vivo* de autoantígeno de células β pancreáticas (32).

Weaver *et al.*, 2001 (34), mostraram que DCs mielóides, provenientes da medula óssea de camundongos NOD, estavam com níveis de ativação do fator de transcrição NF- κ B mais elevados, quando comparados com as demais linhagens de camundongos Balb/c e C57BL. Com isso, os resultados obtidos sugerem que a ativação do NF- κ B nas DCs de camundongos NOD pode levar a estimulação de linfócitos T.

Okubo *et al.*, 2016 (35), Salomon *et al.*, 2000 (36) e Sakaguchi *et al.*, 2006 (37) mostraram que o linfócito T regulador (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Tregs)) desempenham papel importante no controle da DM-1, com frequência de Tregs reduzida em humanos e camundongos com DM-1 quando comparados a grupos saudáveis. Wu AJ *et al.*, 2002 (38), observaram uma deficiência no número de linfócitos Tregs TCD4⁺ CD25⁺ no timo e no baço de camundongos NOD, onde a diminuição destas células são influenciadas pelo meio inflamatório de citocinas, e que efeitos diretos ou indiretos nos linfócitos Treg podem ser o principal mecanismo pelo qual o TNF regula autoimunidade no camundongo NOD.

Favre *et al.*, 2010 (39) mostraram que a produção de IDO em DCs, e a capacidade que essas células tem de inibir a proliferação dos linfócitos *in vitro* pela via do TRP, com propriedades imunomodulatórias em diversas doenças incluindo: alergia, câncer, doenças autoimunes e infecção por HIV.

A atividade enzimática da IDO leva a diminuição do TRP, induzindo a interrupção do ciclo celular no meio da fase G1, levando ao efeito antiproliferativo e aumentando a apoptose de linfócitos T.

A tolerância imunológica em resposta à indução da enzima IDO leva à degradação do aminoácido essencial TRP e na produção de quinureninas nas quais destroem os linfócitos T pró-inflamatórios e induzem a proliferação de linfócitos Treg (11-15). Estes linfócitos representam uma subpopulação de linfócitos TCD4 caracterizada pela expressão da molécula CD25⁺ (cadeia α do receptor de IL-2) e do fator de transcrição FoxP3. Tem a propriedade de induzir a supressão de linfócitos T efetores, impedindo sua ativação e função, sendo importante no controle da resposta imune (16).

As células apresentadoras de antígenos profissionais derivadas da medula óssea podem ser diferenciadas de precursores de células hematopoiéticas usando estimulação *in vitro* com fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (29, 40, 41). Esses protocolos de diferenciação apresentam fonte essencial de DCs imaturas, com baixa expressão de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40 e moléculas MHC classe II) e com capacidade insuficiente para estimular a proliferação de linfócitos T CD8⁺ diabetogênicos (29). Além disso, de maneira dose-dependente de GM-CSF, macrófagos com alta capacidade fagocitária e significativa similaridade com os macrófagos residentes *in vivo* também podem ser diferenciados, com alguns benefícios para seu uso como antiinflamatórios em estudos de triagem (41).

3.4. Células MIN6

Considerando o metabolismo da glicose as células MIN6 se assemelham às células β pancreáticas, característica não encontrada em outras linhagens celulares produtoras de insulina, sendo ferramenta útil em estudos experimentais em diabetes (42), assim como como a HIT (43), MIN6 (44), β TC (45), RIN (46) e INS-1(47). De forma geral, essas células têm a capacidade de estimular a secreção de insulina da mesma forma que às células beta pancreáticas (48). No entanto, as células MIN6 produzem hormônios das ilhotas, como insulina, glucagon, somatostatina e grelina. Nakashima *et al.*, (2009) (44) mostraram também que as células MIN6 apresentam células predominantemente positivas para insulina, e também células duplamente positivas para insulina e glucagon/somatostatina, essas observações podem sugerir que MIN6 é principalmente uma linhagem celular produtora de insulina e pode apresentar um ambiente adequado para secretar a insulina por secreção concomitante de outros hormônios presentes nas ilhotas pancreáticas. Sendo assim, as células MIN6 podem ser usadas para estudar o desenvolvimento, diferenciação celular e

função das ilhotas pancreáticas. Além disso, as passagens sucessivas desta linhagem podem levar à diminuição da capacidade de secreção de insulina. Portanto, ao realizar experimentos, é recomendado utilizar células que tenham passado por número baixo de cultivos (44, 49).

3.5. Estresse oxidativo e Compostos Antioxidantes

O estresse oxidativo pode ser definido como um estado de desequilíbrio entre os fatores que geram radicais livres e os fatores que protegem o organismo, os antioxidantes (50, 51). O estresse oxidativo gerado durante o diabetes pode levar a oxidação de proteínas, carboidratos, enzimas, lipídeos de membrana, DNA e promovendo aumento do processo inflamatório no organismo (52, 53). A melhor compreensão do papel oxidativo no diabetes é importante para novas estratégias de tratamento.

Os antioxidantes são moléculas presentes em baixas concentrações, que inibem o processo oxidativo, eliminando os radicais livres, atuando como agentes de redução. Os compostos antioxidantes atuam principalmente como sequestradores de radicais livres e inibidores essenciais na produção de oxidantes. Eles desempenham papel fundamental na neutralização ou eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e a ligação de íons metálicos que são necessários para a produção das espécies oxidantes (54).

Os mecanismos antioxidantes podem envolver processos enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes podem ser classificados como endógenos, como a glutathione peroxidase, a catalase e o superóxido dismutase. E também como antioxidantes exógenos, provenientes da nossa alimentação como vitaminas A, C, E, minerais, flavonoides, entre outros (55).

Os compostos fenólicos apresentam propriedade antioxidante no organismo com proteção celular dose dependente. Flavonoides e fenóis derivados da dieta, especialmente de fontes provenientes da infusão de folhas, têm sido investigados em diferentes modelos de cultura celular (56). Os resultados encontrados na literatura podem ser divididos basicamente em dois grupos; os compostos que atuam na proteção celular contra o estresse oxidativo e os que agem no combate de células tumorais, apresentando efeitos na prevenção da proliferação e indução a morte dessas células cancerígenas (57).

Em estudos *in vitro* voltados para o diabetes, culturas de células β -pancreáticas apresentam sensibilidade ao estresse oxidativo onde as espécies reativas desempenham papel central na morte de células β , levando ao desenvolvimento do diabetes tipo 1 e possuem relevância no papel patogênico secundário do diabetes tipo 2 (58). Além disso, em culturas de células β pancreáticas, os flavonoides naturais mostraram efeitos protetores sob condições de estresse oxidativo (59).

No nosso trabalho anterior verificamos que o consumo de antioxidantes, provenientes do extrato aquoso do *Passiflora alata* Curtis, auxilia na diminuição de infiltrado celular (CD4⁺, CD8⁺ e CD11c⁺), estresse oxidativo e apoptose nas ilhotas pancreáticas desses animais, além de conservar os níveis de insulina séria e glutathione reduzida no fígado e rins nesses animais (23).

3.6 Antioxidantes presentes no *Passiflora alata* Curtis

O gênero *Passiflora* possui cerca de 500 espécies no mundo, com muitas espécies endêmicas no Brasil (60). Dentre as espécies pertencentes ao gênero, a *Passiflora alata* Curtis (maracujá doce) se destaca por ser reconhecida como um fitoterápico pela Farmacopéia Brasileira (1977) sendo utilizada na terapia ansiolítica e por ser uma das espécies de interesse comercial no país (61). As suas folhas são utilizadas pela medicina popular brasileira como sedativo, tranquilizante e com ação hipoglicemiante para melhorar o controle do diabetes (62-64).

Na composição química do maracujá podemos encontrar compostos fenólicos como flavonoides (vitexina; isovitexina; orientina; rutina; quercetina; isoorientina; vitexina; alcaloides (harmana), saponinas, entre outras (65, 66).

Em estudos anteriores, identificamos os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso das folhas de *P. alata* (catequina, epicatequina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina (23, 24) e investigamos sua ação antioxidante na incidência do diabetes em camundongos NOD, avaliamos o infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas, e o tratamento com o extrato aquoso foi capaz de diminuir a incidência do DM-1, reduzindo o infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas (CD4⁺, CD8⁺ e CD11c⁺). Além disso, evidenciamos diminuição do estresse oxidativo e apoptose nas ilhotas pancreáticas, além da preservação dos níveis de insulina sérica e glutathione reduzida no fígado e rins desses animais. Outro estudo do nosso grupo de pesquisa avaliaram os efeitos *in vitro* do extrato aquoso das folhas de *P. alata* em cultura mista de células T de camundongos NOD com uma linhagem de células beta pancreáticas de camundongos (MIN6) e mostrou aumento de óxido nítrico intracelular e peroxidação lipídica em células T submetidas ao tratamento com o extrato de *P. alata* em comparação ao grupo controle não tratado (67).

Desta forma, nossos resultados apontam para a ação dos efeitos antiinflamatórios de compostos presentes no extrato aquoso de *Passiflora alata* no suporte para tratamento do diabetes tipo 1 experimental. Contudo, estudos complementares considerando a ação desses compostos na diminuição de células infiltrativas e conservação das ilhotas, são necessários para compreensão dos mecanismos regulatórios do processo inflamatório no pâncreas do DM-1. Adicionalmente, a hipótese de que estes compostos administrados cronicamente

possam atuar na regulação direta ou indireta de células dendríticas tolerogênicas derivadas da medula óssea e interferir no processo de ativação específica a antígenos de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD, além de ser atrativa possibilita o estabelecimento de estratégias de terapia de suporte no diabetes autoimune.

Nesse sentido, pode-se observar que os principais efeitos benéficos dos polifenóis nas doenças desencadeadas pelo estresse oxidativo, estão relacionados principalmente às suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes, que atuam como sequestradores de radicais livres.

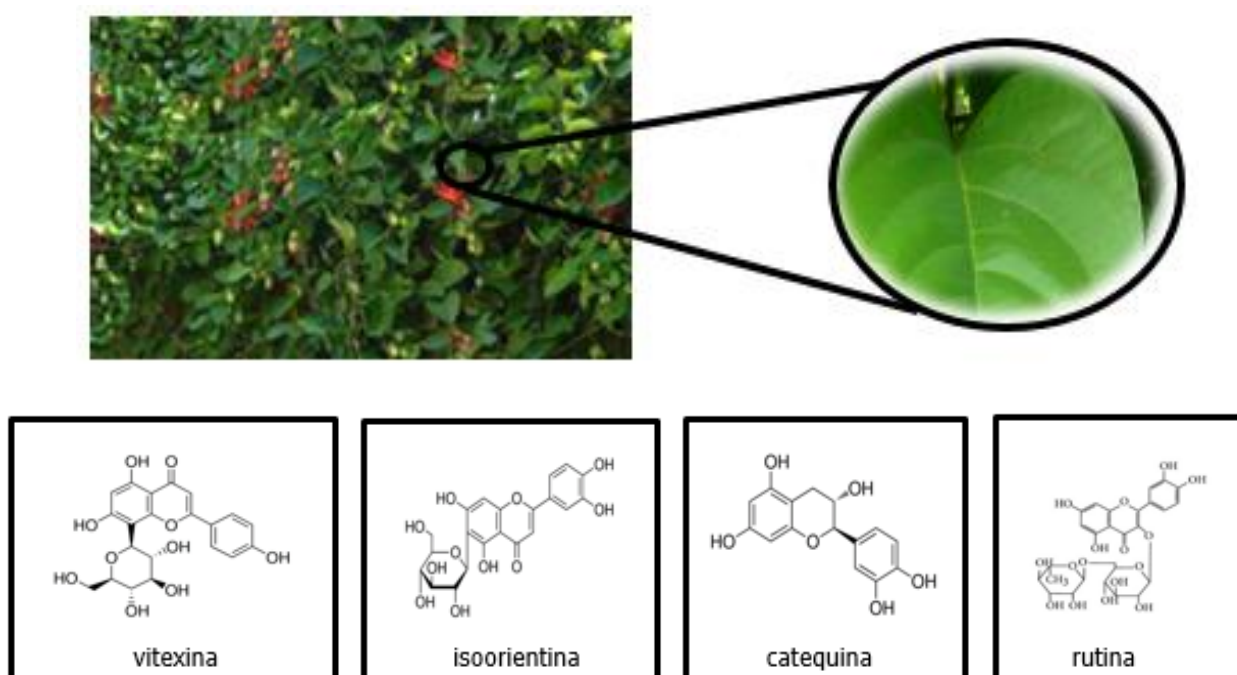


Figura 1: Compostos fenólicos identificados nas folhas de *Passiflora alata* pela técnica HPLC, vitexina, isoorientina, catequina e rutina.

4. MATERIAL E METÓDOS

4.1. Processamento das folhas de *Passiflora alata* Curtis

As folhas do maracujá doce eram coletadas diretamente dos espécimes e secas em estufa com circulação de ar (MARCONI, Piracicaba/SP) a 50 °C com movimentação manual das mesmas durante o processo por 48 horas. Após este período, o material era triturado em liquidificador até a pulverização e, posteriormente armazenado em frascos estéreis de vidro âmbar em ambiente refrigerado (8 °C) até o uso.

A)



B)



Figura 2: A) Folhas do maracujá doce (*Passiflora alata* Curtis). B) Folhas de *Passiflora alata* secas e trituradas em estufa.

4.2. Preparo das soluções e meios de culturas utilizados:

4.2.1. Solução para lavagem da medula óssea

Tampão fosfato tamponado 1M pH 7,2 (PBS), adicionados 10 U/mL de penicilina (Gibco, Life Technologies, NY USA) e 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco). A solução era filtrada posteriormente com membrana 0,22 µm Millipore® (Burlington, Massachusetts, EUA).

4.2.2. PBS e EDTA 10 mM

Tampão fosfato tamponado 1 M pH 7,2 (PBS), adicionados 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), 10 U/mL de penicilina

(Gibco) e 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco). A solução era filtrada posteriormente com membrana 0,22 µm Millipore®.

4.2.3. Meio DMEM 11 mM e DMEM 25 mM completo

O preparo dos meios seguiu a recomendação do fabricante (Gibco) com a adição de 10 U/mL de penicilina (Gibco), 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco), 5 µg/mL de Anfotericina B (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ, EUA) e 10% de soro fetal Bovino (SFB) (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil). Após o preparo, o meio era filtrado com membrana 0,22 µm Millipore® e retirado uma alíquota para controle de qualidade.

4.2.4. Meio de cultura RPMI 1640 completo

O preparo dos meios seguiu a recomendação do fabricante (Gibco) e adicionamos 20 mM HEPES (Gibco), 10 U/mL de penicilina (Gibco), 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco), 5 µg/mL de Anfotericina B (Fisher Scientific) e 10% de SFB (Vitrocell). Após o preparo o meio era filtrado com membrana 0,22 µm Millipore® e retirado uma alíquota para controle de qualidade.

4.2.5. Meio de congelamento

Para o preparo do meio de congelamento, utilizamos 50% de SFB, 40% do meio de cultura DMEM 11 mM completo e 10% DMSO Hybrimax (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

4.2.6. Tripsina com Hanks

Solução salina balanceada de Hanks (HBSS) acrescido do indicador de pH vermelho de fenol, contendo 0,5 mg/mL de tripsina (Sigma-Aldrich) e 0,2 mg/mL de EDTA (Sigma-Aldrich). Após o preparo a solução era filtrada com membrana 0,22 µm Millipore®.

4.3. Preparo do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Passiflora alata* (EALFPA) para tratamento *in vitro*

O extrato era preparado na concentração de 100 mg/mL (folhas secas de *P. alata*/água filtrada) em autoclave a 121°C durante 20 minutos e filtrado posteriormente com membrana 0,22 µm Millipore®. Após a filtração, o mesmo era liofilizado no equipamento

Edwards - super Modulyo (West Sussex, RU). EALFPA para cultura celular era preparado nas seguintes concentrações: 100, 200, 300 e 500 $\mu\text{g/mL}$, diluídos em meio RPMI 1640 11 mM suplementado com 10% SFB.



Figura 3: Preparo do Extrato Aquoso Liofilizado das folhas de *P. alata*.

4.4. Modelos Experimentais e Sacrifício dos animais

Camundongos fêmeas NOD-ShiLt/J (*n*° CEUA 3653-1 e 5077-1A), eram mantidos em condições “*germ free*” no Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica (CEMIB) na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e ambientados para experimentação no biotério experimental do Laboratório de Imunologia Translacional (LIT) com ambiente controlado livre de patógenos comuns (SPF) com controle de luz, temperatura e umidade (26).

Os animais eram ambientados em nosso biotério à partir de 4 semanas de vida e alimentados com ração autoclavada Nuvilab CR e água autoclavada *ad libitum*. O peso corpóreo e a glicemia desses animais eram monitorados semanalmente a partir da 10ª semana até a 30ª semana. Para a dosagem de glicemia esses animais eram deixados em jejum durante 4 horas, e após este período era retirado uma amostra de sangue da veia caudal. Os valores das glicemias eram tabelados semanalmente e os animais eram considerados diabéticos após mensuração em dois dias consecutivos de valores de glicemia acima de 250 mg/dL.

Os animais que apresentaram diabetes ou ao completarem 30 semanas eram sacrificados sendo anestesiados com cloridrato de ketamina (100-200 mg/Kg) e cloridrato de xilasina (5-16 mg/Kg) Vetbrands, Paulínia, SP, Brasil.

Após o sacrifício, eram retirados os ossos (fêmures e tíbias) para extração de medula óssea, e retirado o baço para extração de linfócitos conforme detalhado a seguir para os ensaios de cultura mista. Todo material era coletado em condições estéreis e com número biológico individual, não era realizado pool de amostras. Em alguns experimentos, também utilizamos células de camundongos não diabéticos (glicemia abaixo de 250 mg/dL com 8 semanas de vida) para avaliar a proliferação de linfócitos T e a frequência de Treg. As culturas eram realizadas segundo o esquema a seguir:

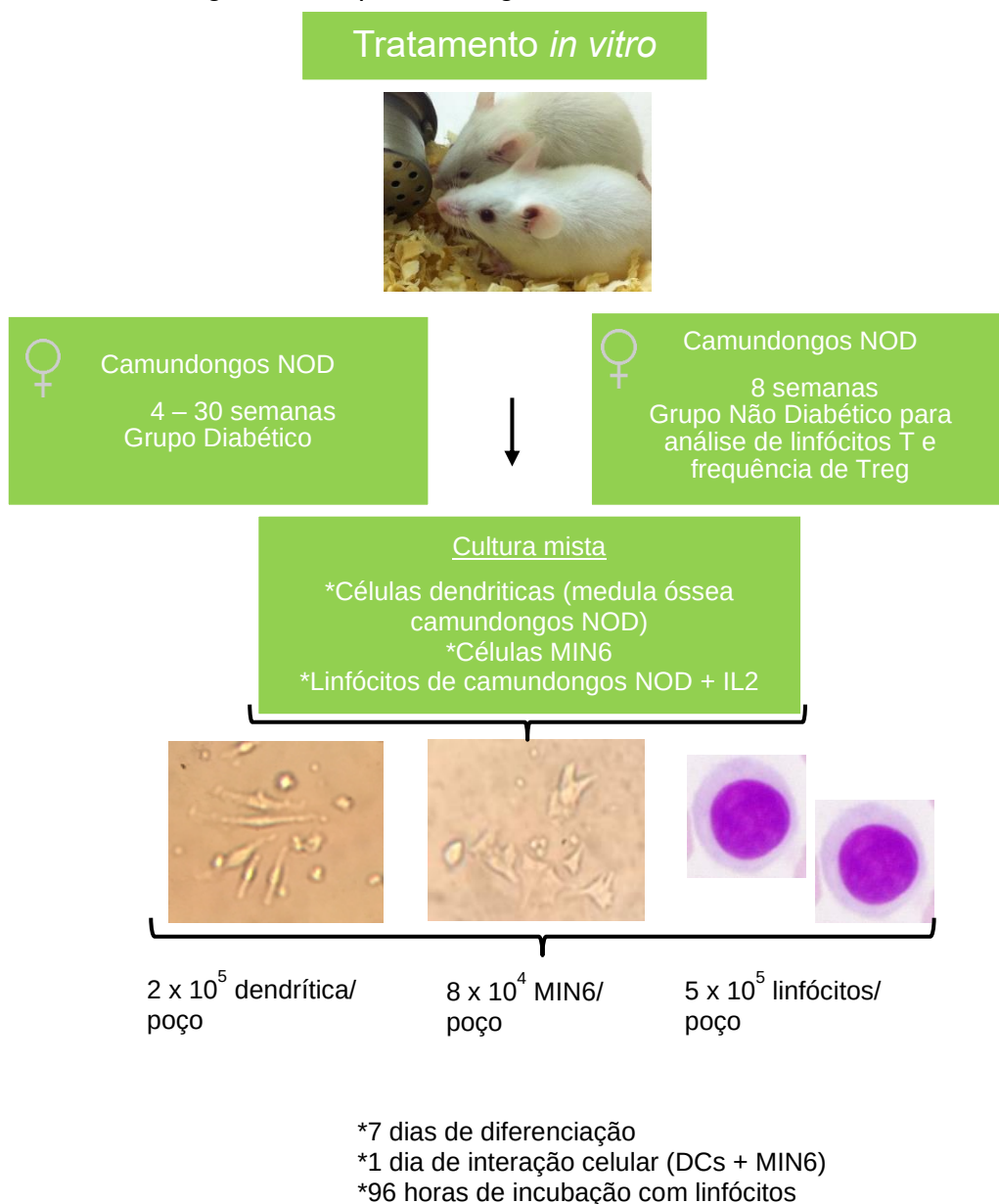
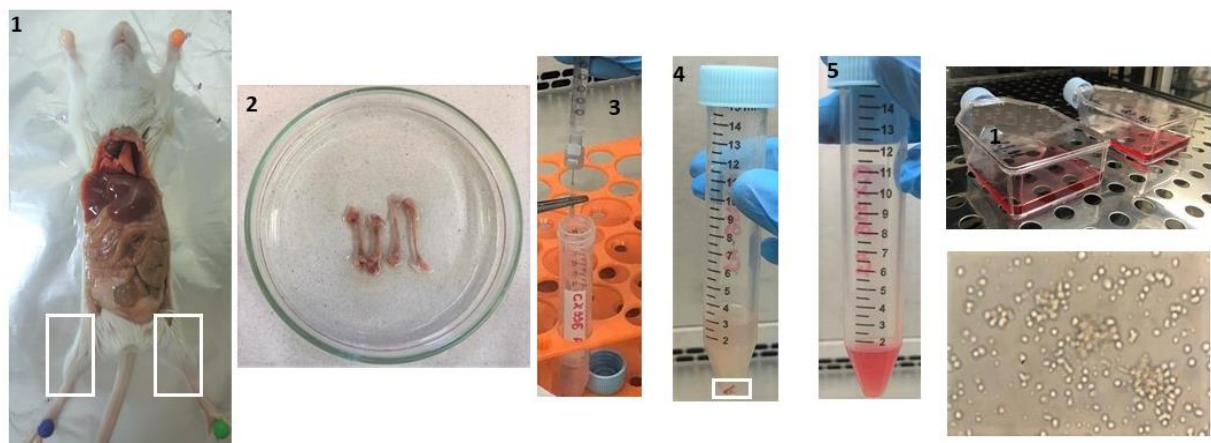


Figura 4: Fluxograma do tratamento *in vitro* dos camundongos NOD diabéticos e não diabéticos.

4.5. Diferenciação *in vitro* de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos

As DCs eram diferenciadas a partir de células precursoras coletadas da medula óssea de camundongos NOD ShiLt/J diabéticos e não diabéticos utilizando-se a técnica descrita por LUTZ *et al.*, (40) com algumas modificações realizadas em nosso laboratório. As células precursoras eram coletadas dos fêmures e tíbias dos camundongos injetando-se PBS para a lavagem do tecido da medula óssea. A suspensão de células da medula era ajustada para a concentração de 4×10^6 células/mL em meio de cultura DMEM 11 mM completo sendo então armazenadas em criotubos, em meio de congelamento até o momento do uso. Para os ensaios de diferenciação das DCs, as células da medula óssea eram descongeladas e ajustadas na concentração de 12×10^6 células viáveis cultivadas em frasco de cultura T75 cm² (Greiner Bio-One, Áustria). Como fator de indução de diferenciação das DCs o meio era suplementado com 20 ng/mL de mouse recombinante (mr) GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, EUA) e incubadas por sete dias à 37 °C, em estufa com 5% de CO₂. O meio de cultura celular era trocado nos dias 3 e 6. Após a incubação por 7 dias as células eram retiradas com PBS/EDTA 10 mM e recultivadas com células de linhagem MIN6 sob estresse conforme descrito no item 4.6.



Diferenciação com citocina GM-CSF por 7 dias

Figura 5: Figuras representativas do procedimento de extração de medula óssea de camundongos NOD. Etapas 1 e 2: Incisão do camundongo e retirada dos fêmures e tíbias. Etapas 3 e 4: Lavagem dos ossos e retirada a medula óssea. Etapa 5: Suspensão de células da medula óssea e posteriormente levadas a cultura para diferenciação com a citocina GM-CSF durante 7 dias.

4.6. Cultura celular das Células MIN6: Manutenção e cultivo

Células de insulinoma de camundongo (MIN6), fornecidas gentilmente pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, do Departamento de Anatomia e Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp, eram preservadas em nitrogênio líquido no LIT e cultivadas em frascos de cultura T25 cm² (Greiner) utilizando-se as passagens de 22 à 40 em meio de cultura DMEM 25 mM de glicose com 10% de SFB, sendo incubadas em estufa 37 °C com de 5% de CO₂. O meio de cultura era trocado a cada 48 horas. Ao atingir 70% de confluência, as células MIN6 foram incubadas por 24 horas em meio com alto teor de glicose para induzir o estresse celular (como fonte de antígenos de células beta na cultura mista), em meio de cultura DMEM 100 mM de glicose suplementado com 10% de SFB, promovendo uma ruptura celular e consequente exposição de componentes antigênicos. Após as 24 horas de estresse as células MIN6 eram retiradas dos frascos de cultura com solução tripsina (0,5 mg/mL) e Hanks (HBSS) e posteriormente transferidas para placa de 6 poços na concentração de 8x10⁴ células viáveis/poço para cultura mista conforme abaixo no item 4.8.

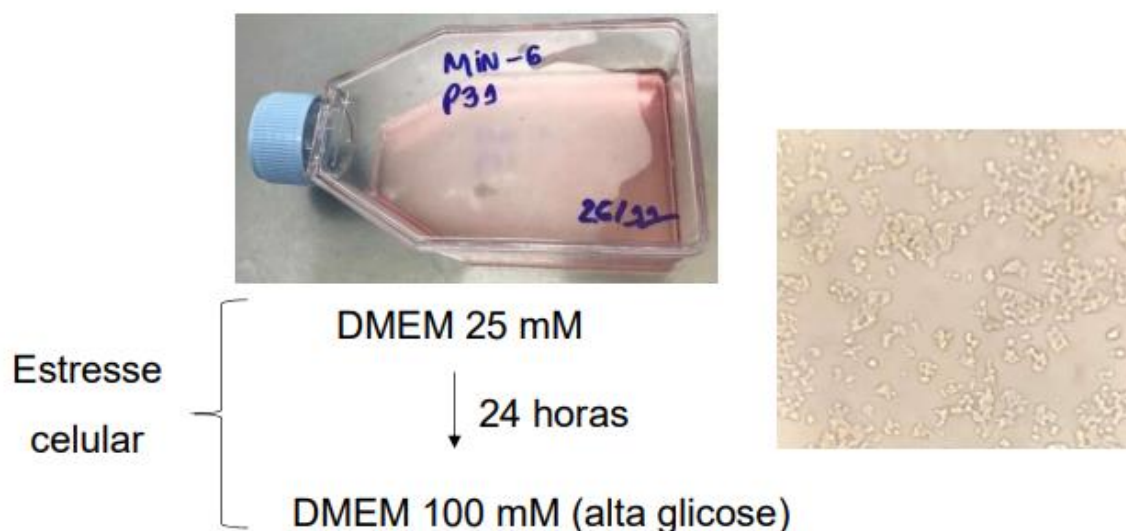


Figura 6: Imagem representativa do procedimento de manutenção das células MIN6 sob estresse celular com meio com concentração alta de glicose (100 mM) durante 24 horas.

4.7. Extração de linfócitos para os ensaios de cultura mista

Os linfócitos T eram extraídos a partir de suspensões celulares de baços de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos, os órgãos extraídos eram assepticamente transferidos para frascos estéreis contendo meio de cultura RPMI completo - RPMI 1640

(Gibco), com 20 mM HEPES (Gibco), 10 U/mL de penicilina (Gibco), 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco), 5 µg/mL de Fungizone (Gibco) e 10% de soro bovino fetal (SFB) (Vitrocell). Conforme mostrado na Figura 7, os baços eram macerados em peneira esterilizada para dissociação dos órgãos e obtenção das suspensões celulares. Após a lavagem com o meio de cultura e centrifugado por 5 minutos a 400 x g, as células eram ressuspensas em 3 mL de tampão Cloreto-Potássio e Amônio (ACK) (NH_4Cl - Merch, Rio de Janeiro, RJ, Brasil e KHCO_3 - Synth, Diadema, SP, Brasil), EDTA (Sigma), H_2O) e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para lise de hemácias. Em seguida, as células eram ressuspensas em 10mL de meio de cultura, acrescido com 10% SFB e centrifugadas à 400 x g por 5 minutos. Por fim, as suspensões celulares obtidas eram enriquecidas na fração de linfócitos T, por meio de protocolo de adesão celular em colunas de lã de nylon conforme descrito por Henry e cols. (68). Os linfócitos eram corados com azul de Tripán para contagem de células viáveis na câmara de Neubauer utilizando como fator de diluição 1:20 e posteriormente semeados em placas de cultivo celular na concentração de 5×10^5 células viáveis/poço.

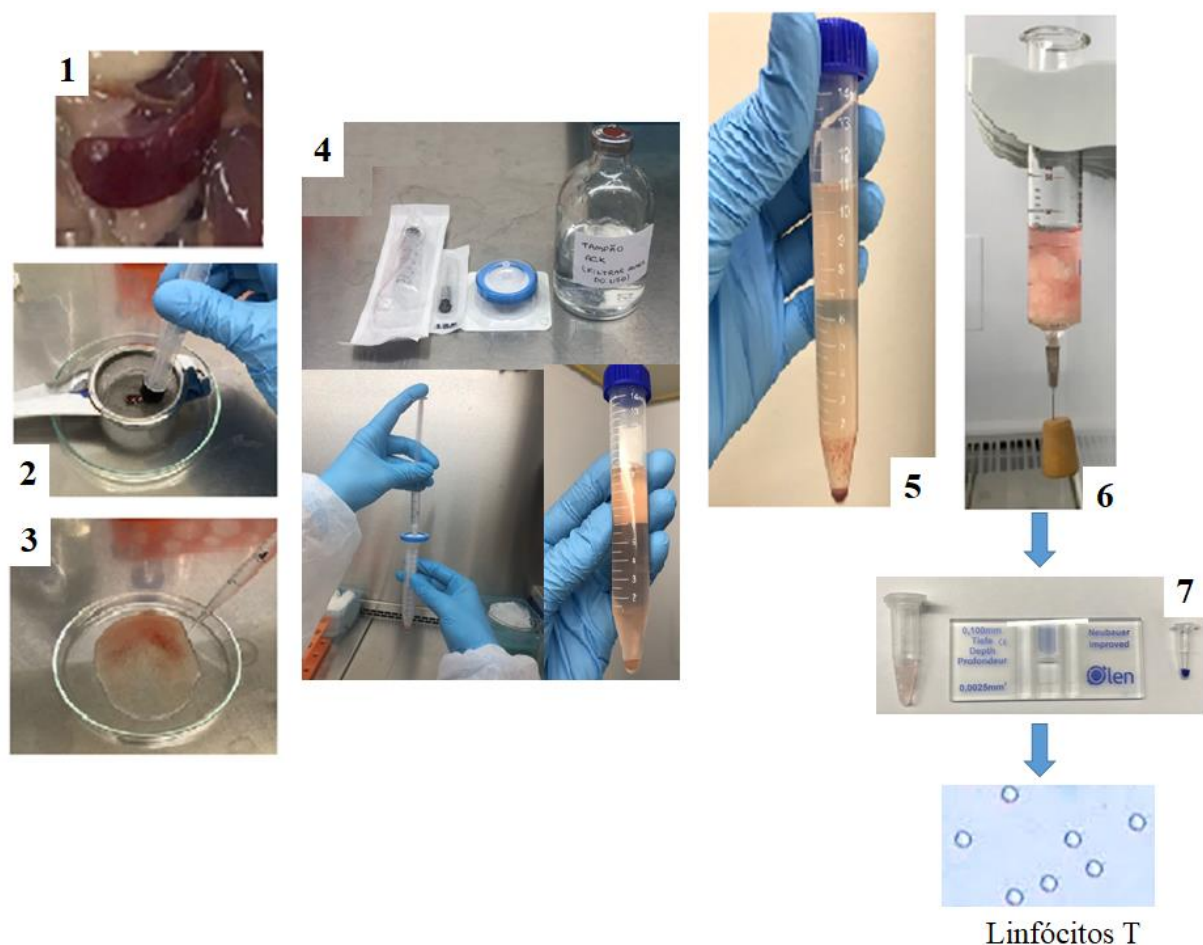


Figura 7: Imagem representativa da extração de linfócitos dos camundongos NOD diabéticos e não diabéticos por adesão celular em coluna de lã de nylon. Etapa 1: Extração do baço.

Etapas 2 e 3: Baço sendo macerado e suspensão celular sendo homogeneizada. Etapa 4: Preparo e filtração da solução ACK. Etapa 5: Suspensão celular com lise de hemácias. Etapa 6: Incubação das células em lã de nylon. Etapa 7: contagem de linfócitos em câmara de Neubauer.

4.8. Preparo da cultura mista (DCs, MIN6 e linfócitos T) de camundongos NOD

Para cada procedimento de cultura celular, eram realizados três ensaios, e todos os grupos analisados eram semeados em triplicata nas placas de cultura, sendo então o número (n) biológico de 5 animais por ensaio, e o número total de repetições era de 15.

A cultura celular mista era composta pelas células abaixo conforme descrito na Figura 8:

- *Células dendríticas diferenciadas a partir da medula óssea de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos (item 4.5).

- *Células MIN6 submetidas ao estresse contendo alta concentração de glicose (100 mM de glicose) (descritas no item 4.6).

- *Linfócitos T extraídos do baço de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos (descritas no item 4.7).

As culturas células eram mantidas em estufa com condições de 5% de CO₂ à 37 °C por 96 horas, com posterior análise em citômetro de fluxo BD FACsVerse (BD-Bioscience San Jose, CA, EUA).

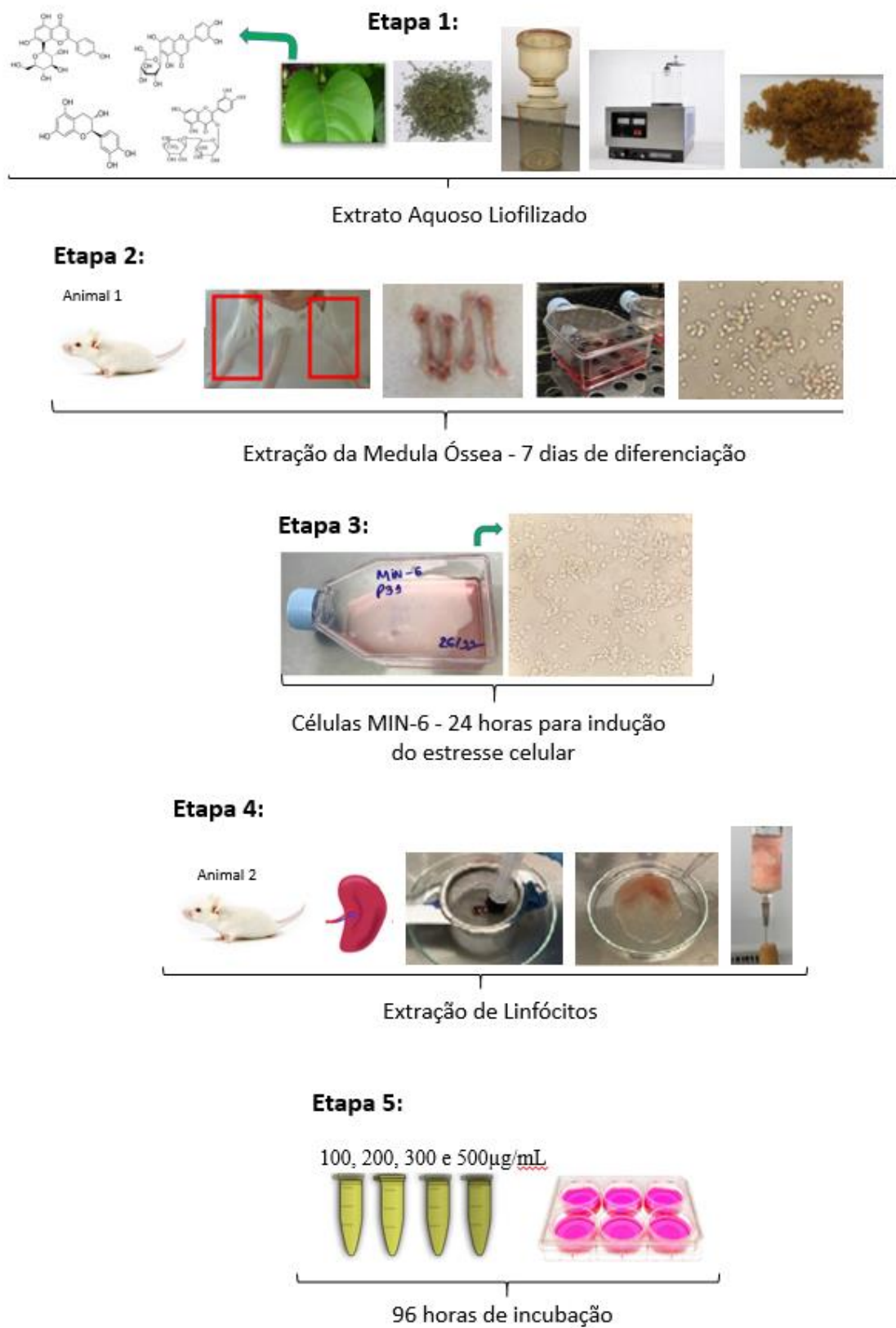


Figura 8: Imagens representativas para o preparo de cultura mista. Etapa 1: Preparação do extrato aquoso liofilizado. Etapa 2: extração e diferenciação da medula óssea por 7 dias em

células dendríticas. Passo 3: Células MIN6 sob estresse celular por 24 horas. Passo 4: Extração de linfócitos retirados do baço dos camundongos através da coluna de lã de nylon. E Etapa 5: Incubação por 96 horas de células dendríticas, células MIN6, linfócitos e as concentrações de extrato aquoso liofilizado de *Passiflora alata*.

Após o procedimento de diferenciação das DCs, estas eram semeadas em placas de 6 poços (Techno Plastic Products, Schaffhausen, Suíça) na concentração de 2×10^5 células viáveis/poço em meio de cultura RPMI completo e incubadas com células MIN6 sob estresse na concentração de 8×10^4 células viáveis/poço. Após a ambientação celular por 24 horas, foram adicionados os linfócitos T obtidos de camundongos NOD, os quais eram transferidos para o mesmo poço das DCs na concentração de 5×10^5 células viáveis/poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, acrescido da citocina recombinante IL-2 de camundongo (mrIL-2, Peprotech, Rocky Hill NJ, EUA) na concentração de 10ng/mL por 96 horas a 37 °C em estufa com 5% CO₂.

Para as análises de proliferação linfócitos T eram previamente marcadas com 1,25µM da sonda CFSE (fluorescente de éster de carboxifluoresceína succinimidil) (Biolegend™, San Diego, Califórnia, EUA) de acordo descrito por Lyons *et al.*, (69).

Conforme demonstrado na Figura 9, as culturas celulares eram preparadas sob estímulo de EALFPA (considerado como grupo tratado) ou sem estímulo (grupo não tratado – NT). O controle celular de proliferação era estabelecido por culturas celulares estimuladas com 5 µg/mL de Concanavalina A (ConA). Nos grupos tratados era adicionado o EALFPA nas concentrações 100, 200, 300 e 500 µg/mL para o ensaio de viabilidade células. Para os ensaios de proliferação celular e análise de marcadores de BM-APCs utilizamos as concentrações 100, 200 e 300 µg/mL. Para os ensaios de quantificação de citocinas em sobrenadantes e avaliação das Tregs era empregando concentração de 300 µg/mL de EALFPA. As culturas celulares mistas eram incubadas durante 96 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período de incubação celular, os sobrenadantes eram removidos dos poços e armazenados para ensaios futuros de quantificação de citocinas, as culturas celulares eram coradas com marcadores específicos para procedimentos de citometria de fluxo.

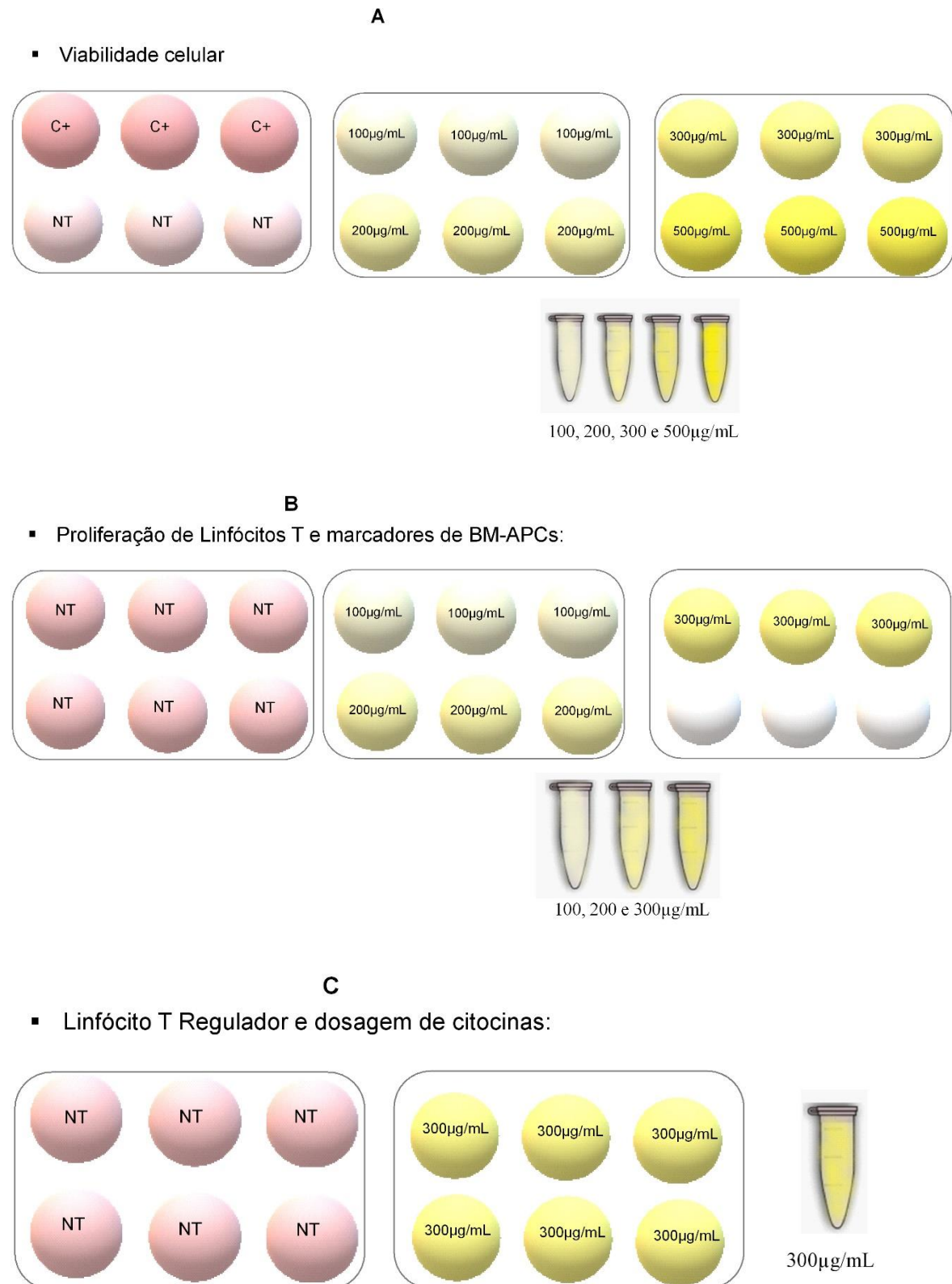


Figura 9: Placas representativa do tratamento *in vitro* das culturas celulares mistas com células dendríticas, MIN6, e linfócito T. Segue a classificação dos grupos: C+ (controle celular proliferativo com 5 µg/mL de (ConA)). NT (cultura não tratada). E os demais poços as

concentrações de EALFPA 100, 200, 300 e 500 µg/mL. (A) Placa para viabilidade celular. (B) Placa para Proliferação de linfócitos T e marcadores de BM-APCs. (C) Placa de Linfócito T regulador e dosagem de citocinas.

4.9. Proliferação de linfócitos

Para a avaliação da proliferação celular, linfócitos T eram previamente marcados com a sonda CFSE conforme descrição do fabricante. A sonda CFSE determinava a proliferação dos linfócitos pela perda da intensidade de fluorescência a cada divisão celular. Após o período final de incubação da cultura mista (96 horas), os linfócitos eram lavados com PBS 1 M e centrifugados por 5 minutos (400×g). Para a determinação das populações de linfócitos TCD4 e TCD8 os mesmos eram marcados com sonda de viabilidade celular Zombie NIR™ (Biolegend) seguida por anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (todos da Biolegend): anti-mouse CD4 APC e anti-mouse CD8 Percp Cy5.5 na concentração de 0,25µg/2,5x10⁵ de linfócitos em 100 µL de tampão de marcação. Os linfócitos eram novamente lavados com PBS 1 M, centrifugados nas mesmas condições acima, fixados em PBS 1 M formaldeído 1% e mantidos sob refrigeração (8 °C) para posterior aquisição das amostras em citômetro de fluxo BD FACSVerse (BD-Bioscience San Jose, CA, EUA). A análise era feita por Citometria de Fluxo no programa FCS Express 6 DeNovo Software (Glandale, Califórnia, EUA), adquirindo 5.000 eventos na população selecionada conforme quadrantes (gates) de seleção demonstrado nas Figura 10.

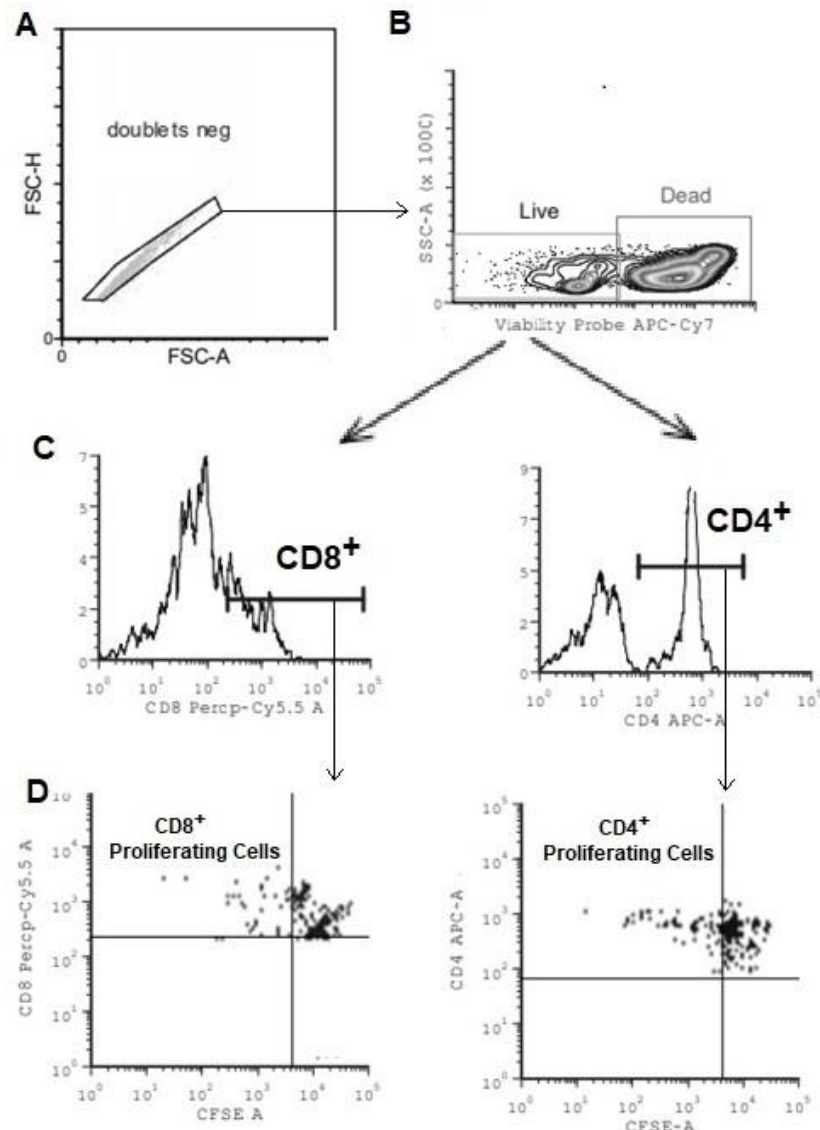


Figura 10: Imagens representativas das culturas celulares das populações selecionadas com base no tamanho (FSC- Forward Scatter – Painel A) e complexidade interna (SSC-Side Scatter – Painel B). No painel B é possível separar as populações viáveis e mortas. No quadrante C dentre as células viáveis selecionadas era possível separar populações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. E no quadrante D as mesmas populações de CD4⁺ e CD8⁺ que estão em proliferação.

4.10. Avaliação Tregs e IL-2

Linfócitos Tregs produtores IL-2 eram analisadas nas células não coradas com CFSE. Após o período de cultura mista com as BM-APC e MIN6, o perfil de ativação dos linfócitos T era avaliado por meio da frequência de células: CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ (Treg)). Os linfócitos inicialmente eram permeabilizados com o tampão específico Foxp3⁺ Fix/Perm Buffer (Biolegend) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente os linfócitos eram

marcados com anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos (Biolegend), anti-CD4 Percp Cy5.5, anti-CD25 APC e anti-FoxP3 PE. Para análise de IL-2 as células eram marcadas com anticorpos anti-CD4 FITC, anti-CD8 Percp Cy5.5 ambos com anti-IL-2 PE; conforme descrito anteriormente (70). A análise era feita por Citometria de Fluxo no programa FCS Express 6 DeNovo Software (Glandale, Califórnia, EUA), adquirindo 5.000 eventos na população selecionada conforme gates demonstrado nas Figura 11 e 12.

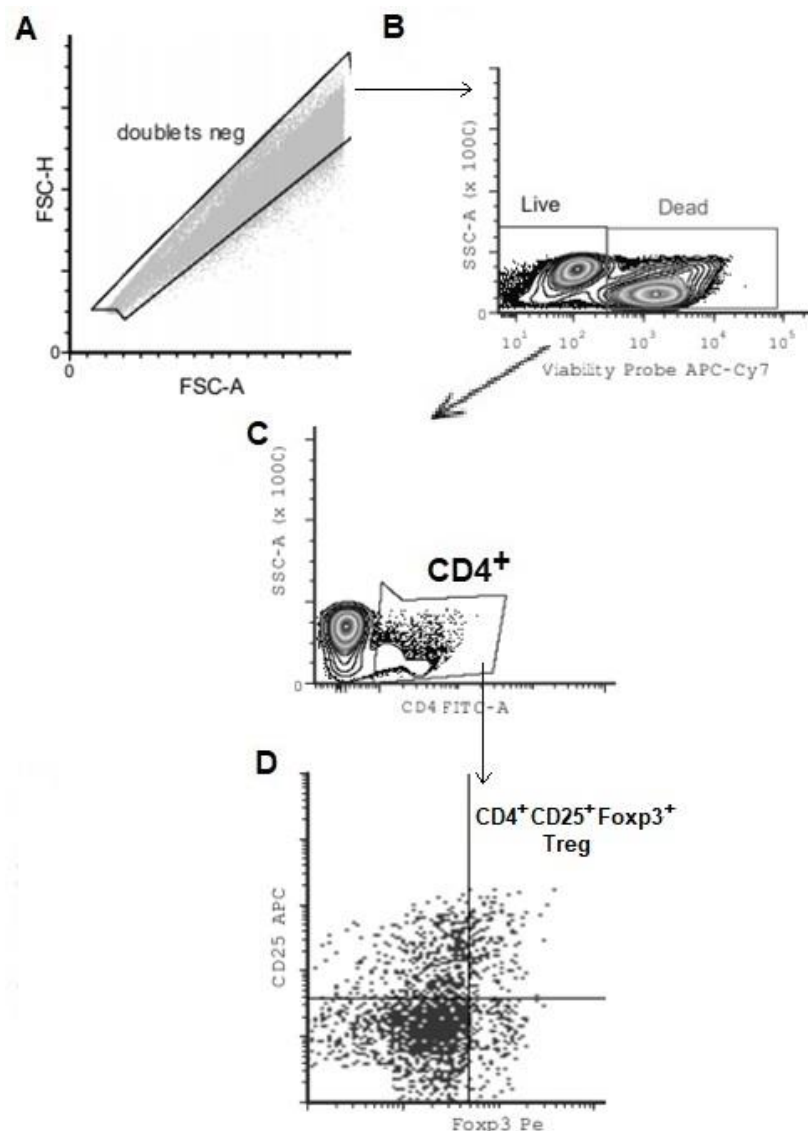


Figura 11: Imagens representativas das populações selecionadas com base no FSC (Painel A) e SSC (Painel B). No painel B é possível separar as populações viáveis e mortas. No quadrante (C) dentre as células viáveis selecionadas era possível separar populações de linfócitos CD4⁺ e no quadrante (D), CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺.

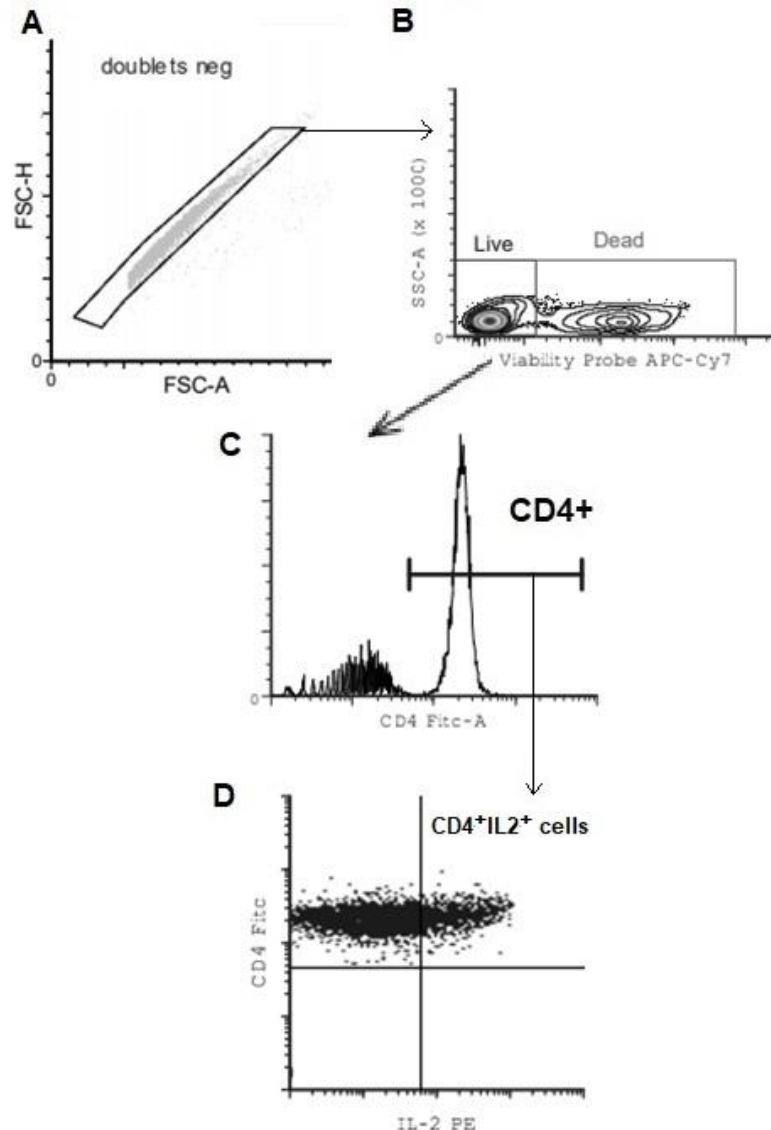


Figura 12: Imagens representativas das populações selecionadas com base no FSC (Painel A) e SSC (Painel B). No painel B é possível separar as populações viáveis e mortas. No quadrante (C) dentre as células viáveis selecionadas era possível separar populações de linfócitos $CD4^+$ e no quadrante D as mesmas populações de $CD4^+$ e $IL-2^+$.

4.11. Avaliação dos marcadores celulares de DCs tolerogênicas na presença de células MIN6

Para avaliar o perfil de ativação das DCs e marcadores relacionados com o perfil tolerogênico destas células, era analisada a expressão da molécula co-estimulatória CD86, bem como da enzima IDO. Para isto marcamos as células utilizando anticorpos específicos conjugados à fluorocromos para os marcadores de superfície anti-mouse F4/80 para a marcação da população de DCs e os anticorpos anti-mouse CD86 (Biolegend) para avaliar a expressão da molécula co-estimuladora, seguindo as recomendações dos fabricantes. Para

a marcação da enzima IDO-1 as células eram previamente fixadas e permeabilizadas com tampões específicos Fixation Buffer e Permeabilization Wash Buffer (Biolegend) e em seguida marcadas com o anticorpo anti-mouse IDO-1 (Novus Biological) conforme recomendação do fabricante. A aquisição das amostras era feita por Citometria de Fluxo e a análise no programa FCS Express 6 DeNovo Software (Glandale, Califórnia, EUA), adquirindo 5.000 eventos na população selecionada conforme Figura 13.

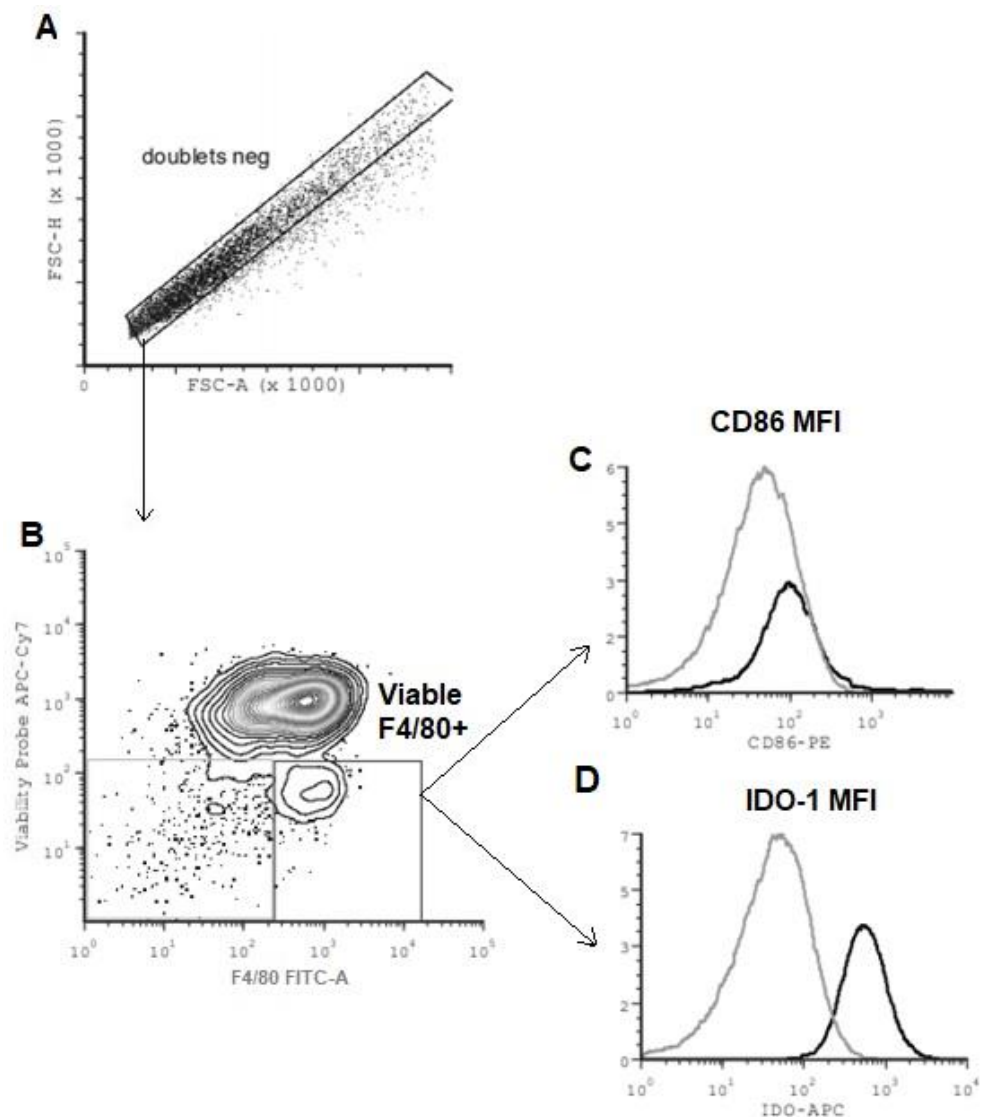


Figura 13: Imagens representativas das populações selecionadas com base no FSC (Painel A) e SSC (Painel B). No painel B é possível separar as populações viáveis e mortas e selecionar a população de interesse F4/80. No quadrante (C) selecionar dentro de F4/80 a população de CD86⁺ e no quadrante (D) selecionar a população IDO⁺.

4.12 Análise por Citometria de fluxo

Em todos os procedimentos de citometria de fluxo, as células eram coradas com controles isotípicos para cada marcador celular analisado para ajustes de settings do aparelho. Os controles isotípicos são utilizados para estimar o número de células que reagem de forma não específica com o anticorpo a ser estudado.

As amostras eram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACsVerse (BD-Bioscience San Jose, CA, EUA). Para selecionar populações com base no tamanho (FSC-Forward Scatter) e complexidade interna (SSC-Side Scatter) eram adquiridos 5.000 eventos nas populações selecionadas delimitadas, viabilidade e marcadores de superfície específicos. Estes dados (FSC/SSC) eram dispostos sob a forma de dot-plots e analisados no programa computacional FCS Express 6 DeNovo (Glandale, Califórnia, EUA). Os resultados eram expressos como a frequência das populações selecionadas e as expressões dos marcadores avaliadas pela mediana da intensidade de fluorescência dos respectivos fluorocromos.

4.13. Quantificação das citocinas

As citocinas IL-6 e IFN- γ liberadas nos sobrenadantes das culturas mistas (DCs, MIN6 e linfócitos T) eram determinadas por ensaio ELISA, utilizando os kits: Mouse IL-6 e Mouse IFN- γ (eBioscience, Fisher Scientific, Fair Lawn NJ, EUA) e as curvas estabelecidas em duplicata de acordo com as recomendações do fabricante nas concentrações 3,9 à 500 pg/mL (IL-6) e de 3,9 à 1000 pg/mL para IFN- γ . Posteriormente eram lidas em 450nm no aparelho de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Device, CA, EUA) em curva de 4 parâmetros.

As citocinas TNF- α , IL-10 e IL-17 eram quantificadas pelo kit *Legendplex Mouse Inflammation Panel* (Biolegend) utilizando as recomendações do fabricante conforme figura 14, onde as curvas eram preparadas em duplicata na concentração de 12,2 à 50.000 pg/mL. A análise era feita no citômetro BD FACSVerse (BD Biosciences). As análises eram realizadas utilizando o software Legendplex v8.0 (Biolegend) e posterior quantificação das citocinas nos sobrenadantes.

LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel

Assay Procedure Summary for V-bottom Plate

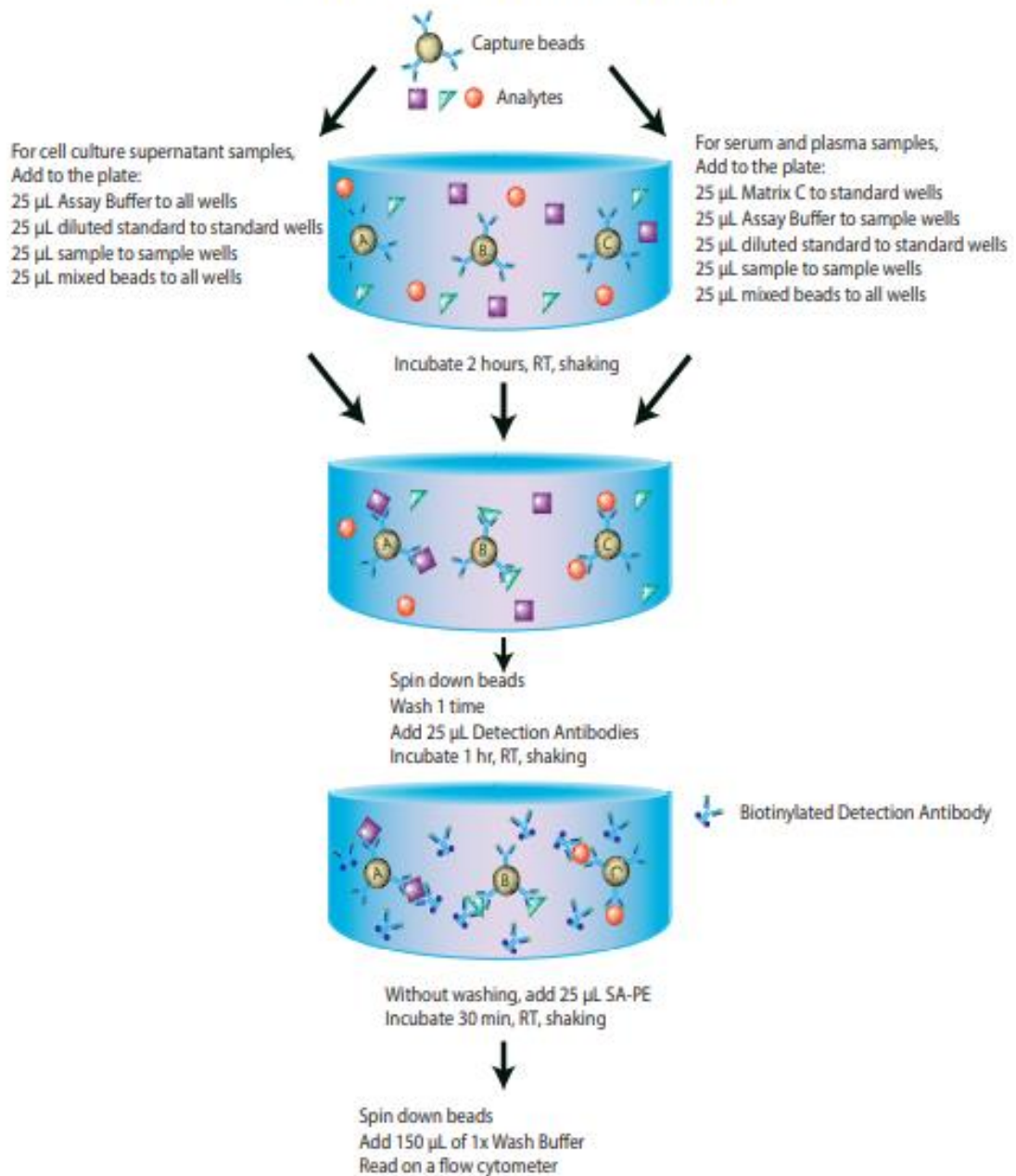


Figura 14: Imagem representativa da quantificação das citocinas realizada pelo kit Legendplex Mouse Inflammation Panel.

4.14. Análise Estatística

Os resultados das análises foram expressos como média $\pm$ erro padrão (EPM), e os dados submetidos à análise de variância (Kruskal-Wallis) com pós-teste de Dunn para múltiplas comparações ou teste Mann Whitney quando indicado. As diferenças estatísticas analisadas eram consideradas significativas de acordo com os seguintes valores de p, sendo: $p < 0.05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****). O programa computacional Prisma GraphPad® versão 6 (La Jolla, CA, USA) era empregado para as análises estatísticas.

4.15. Formatação de Texto

Para a formatação das citações e referências bibliográficas, empregou-se o programa computacional EndNote X7 (Copyright The Thompson Corporation, EUA) no formato Vancouver, segundo as normas da Comissão de Pós-Graduação de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp.

5. RESULTADOS

5.1 Incidência do Diabetes

Os camundongos NOD apresentaram incidência do Diabetes de 80,8% (com glicemia ≥ 250 mg/dL) (Gráfico 1). Assim, a distribuição da incidência mostrou: 15 semanas de vida 14,1%, com 20 semanas 51,3% e com 30 semanas 80,8%. É importante enfatizar que os animais do grupo Basal (para análise de linfócito T regulador) foram acompanhados até 8 semanas de vida, sem manifestação do diabetes, como demonstrado no gráfico abaixo.

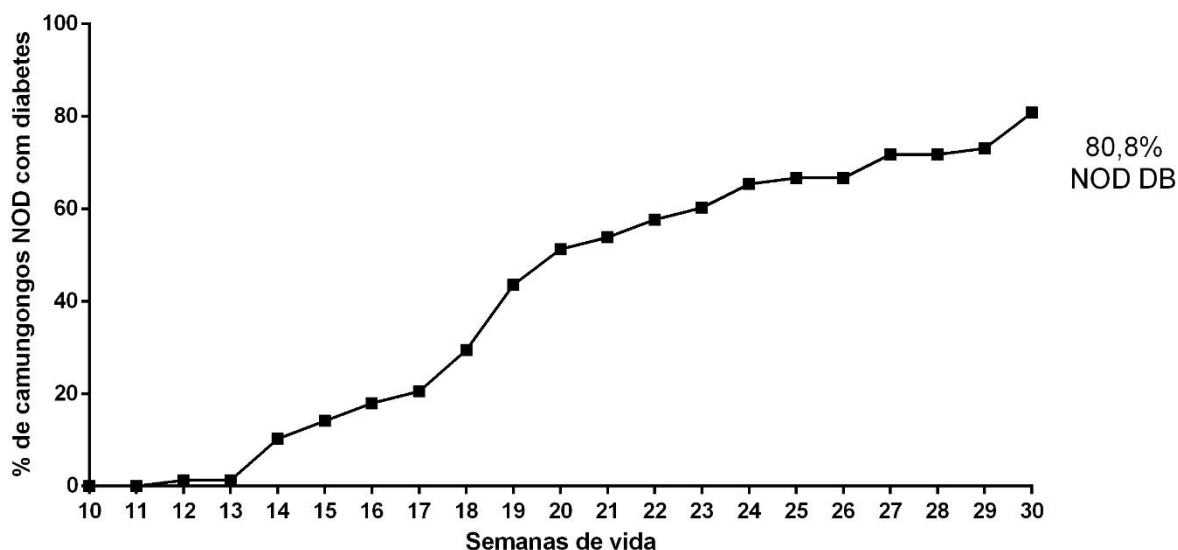


Gráfico 1: Frequência cumulativa sobre a incidência do diabetes nos camundongos NOD ShiLt/J. Observa-se que 80,8% dos animais ficaram diabéticos ao longo das 30 semanas de vida.

5.2 O EALFPA inibe a proliferação de linfócitos T de camundongos NOD diabéticos, mas não afeta a proliferação de IL-2.

Para avaliar o efeito do EALFPA na proliferação de linfócitos T efetores CD4⁺ e CD8⁺, estabelecemos um modelo de cultura mista usando suspensões de células T enriquecidas obtidas de baços de camundongos NOD diabéticos co-cultivadas com células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos NOD diabéticos e células MIN6 sob estresse.

Os linfócitos T obtidos de camundongos diabéticos foram submetidos inicialmente a cultura de células com diferentes concentrações do EALFPA: 100, 200, 300 e 500 µg/mL para análise de viabilidade celular com corante Zombie NIR™ (Gráfico 2), onde foi possível verificar efeito semelhante nas dosagens de 300 e 500 µg/mL; no entanto a toxicidade impactou a viabilidade celular na dosagem de 500 µg/mL, sendo então excluída essa dosagem na análise de proliferação celular.

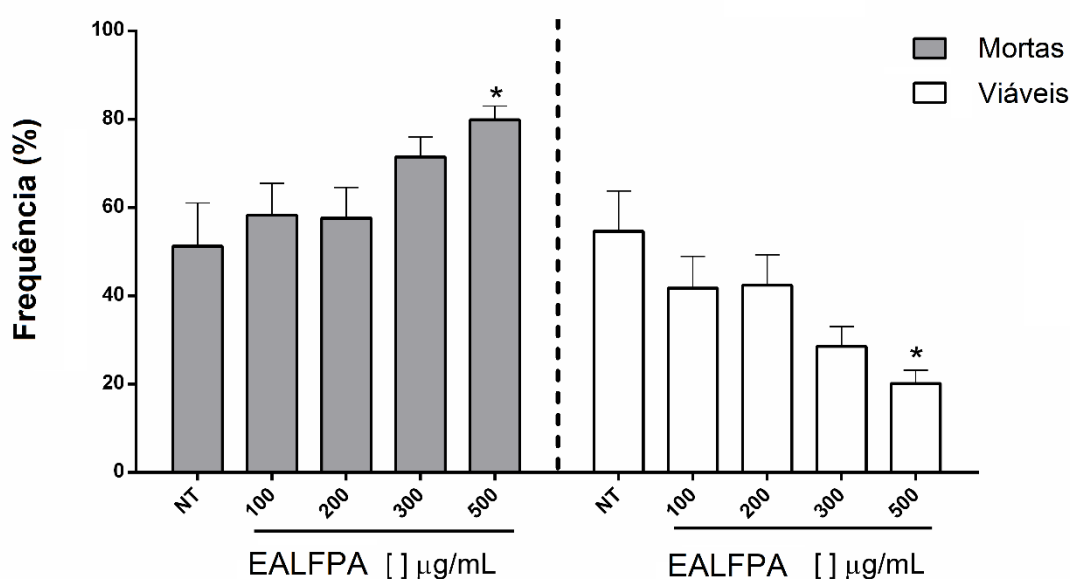


Gráfico 2: Gráfico representativo da frequência (%) de células mortas (barras cinzas) e células viáveis (barras brancas) em culturas mistas de camundongos NOD diabéticos. * $p < 0,05$ ($n=15$). Análise estatística de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Para comparar o comportamento celular entre camundongos diabéticos e não diabéticos, utilizamos como controle camundongos NOD não diabéticos com até 8 semanas de vida. Para a análise de proliferação de linfócitos T as culturas mistas de camundongos diabéticos foram submetidas com diferentes concentrações de EALFPA: 100, 200 e 300 µg/mL, enquanto culturas com linfócitos T de camundongos não diabéticos foram tratados somente na dose de 300 µg/mL de EALFPA (dose definida como ponto final). A conA foi adicionada como estímulo de referência para o controle positivo de proliferação celular. Os linfócitos T foram corados com a sonda CFSE, e a frequência das células foram medidas mostrando uma redução da intensidade de fluorescência (CFSE low) em populações de células T CD4⁺ conforme demonstrado no Gráfico 3 - Painéis B e D e CD8⁺ no Gráfico 4 - Painéis B e D.

Como mostrado nos Gráficos 3 e 4 o EALFPA na concentração de 300 µg/mL inibiu significativamente a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos diabéticos quando comparados ao grupo não tratado (NT); sendo CD4⁺ (2.4% ± 0,5 vs 17.2% ± 3.9) (*p<0,05, Gráfico 3 - Painel A). E CD8⁺ (4.5%±0.8 vs 29.2% ± 7.4) (*p<0,05, Gráfico 4 - Painel A).

No entanto, não foi observado o mesmo padrão nas culturas celulares de camundongos não diabéticos para população de linfócitos T CD4⁺ (12,0% ± 1,9 vs 13,3% ± 1,7) (p>0,05, Gráfico 3 - Painel C), e em CD8⁺ (12,1% ± 0,8 vs 9,3% ± 0,37) (p>0,05, Gráfico 4 - Painel C).

Os valores médios da proliferação basal de linfócitos de camundongos diabéticos não estimulados com ConA foram de 8% para linfócitos T CD4⁺ e 9% para linfócitos CD8⁺. Em contraste, os camundongos não diabéticos apresentaram média de 4,4% para CD4⁺ e 2,2% para CD8⁺.

Uma vez que a produção autócrina de IL-2 pelos linfócitos T desempenha um papel fundamental na sua ativação, avaliamos a detecção intracelular nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em culturas celulares mistas de camundongos NOD diabéticos. O ensaio foi realizado na ausência (-) e presença (+) de BM-APC, conforme demonstrado nos quadrantes dos gráficos de pontos (Gráficos 5B e D e 6B e D, respectivamente).

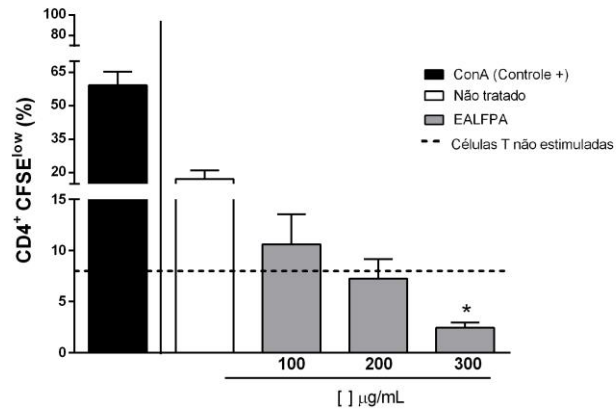
Os painéis B e D (Gráfico 5) mostram a população de IL-2⁺ em linfócitos T CD4⁺ cultivados na ausência (-) e na presença (+) de BM-APC, respectivamente. Em contraste os painéis B e D (Gráfico 6) representam as células IL-2⁺ na população de linfócitos T CD8⁺ nas mesmas condições.

As porcentagens de linfócitos CD4⁺ IL-2⁺ (Gráfico 5 - Painel A) não apresentaram diferença estatística significativa comparando com culturas celulares mistas tratadas com 300 µg/mL de EALFPA com o grupo não tratado (11,22% ± 1,45 vs 10,22% ± 1,80). Da mesma forma, não houve diferença estatística significativa nas porcentagens de linfócitos CD8⁺ IL-2⁺ (Gráfico 6 – Painel B) ao comparar culturas tratadas com EALFPA com culturas não tratadas (2,42% ± 0,63 vs 1,55% ± 0,41).

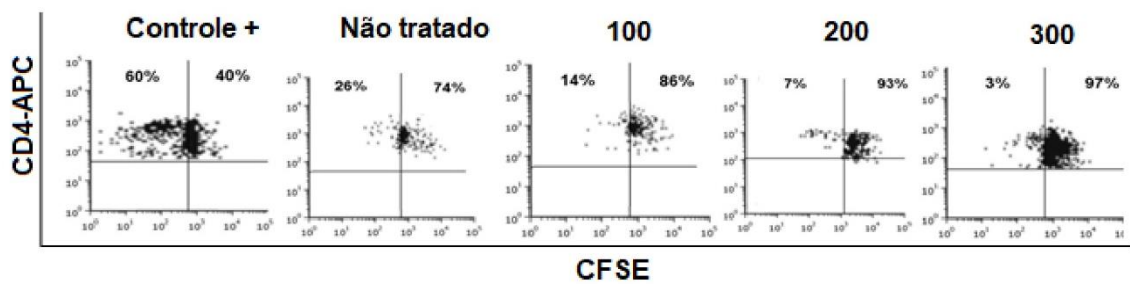
No entanto, observamos que a ausência de BM-APCs no tratamento com EALFPA levou à inibição da produção de IL-2⁺ pelos linfócitos T CD4⁺ (7,07% ± 1,06 vs 1,39% ± 0,59, p=0,0006) (Gráfico 5 - Painel A) e por linfócitos T CD8⁺ (3,16% ± 0,23 vs 1,86% ± 0,12, p = 0,0019) (Gráfico 6 - Painel A).

A

Linfócitos TCD4⁺ Diabético

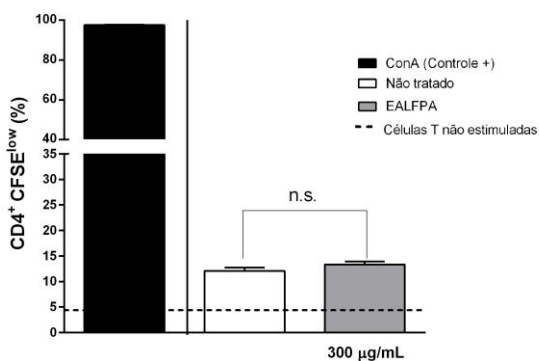


B



Linfócitos TCD4⁺ Não-diabético

C



D

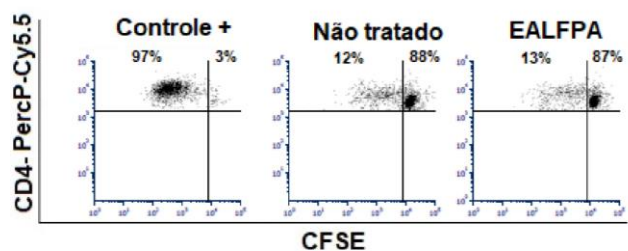


Gráfico 3: Proliferação de células T CD4⁺ em culturas mistas (linfócitos, BM-APC e células MIN6 sob estresse) tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média±EPM de CD4⁺CFSE^{low} (população em proliferação de linfócitos T CD4⁺) de camundongos NOD diabéticos (A) e não diabéticos (C). As barras pretas representam as culturas submetidas ao mitógeno Concanavalina A (ConA: controle +), as barras brancas representam as culturas

sem tratamento (NT), as barras cinzas são culturas tratadas com 100, 200 e 300 µg/mL de EALFPA nos camundongos diabéticos, e a barra cinza nos camundongos não diabéticos tratada com 300 µg/mL de EALFPA. A linha tracejada horizontal representa níveis basais de proliferação de linfócitos T não estimuladas. Os painéis B e D são gráficos de pontos mostrando o CFSE^{high} (superior direito, linfócitos T CD4⁺ não proliferativas) e CFSE^{low} (superior esquerdo, T CD4⁺ proliferativas) de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos, respectivamente. * $p < 0,05$ (n=15) em comparação com o grupo NT. Para a análise estatística utilizamos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

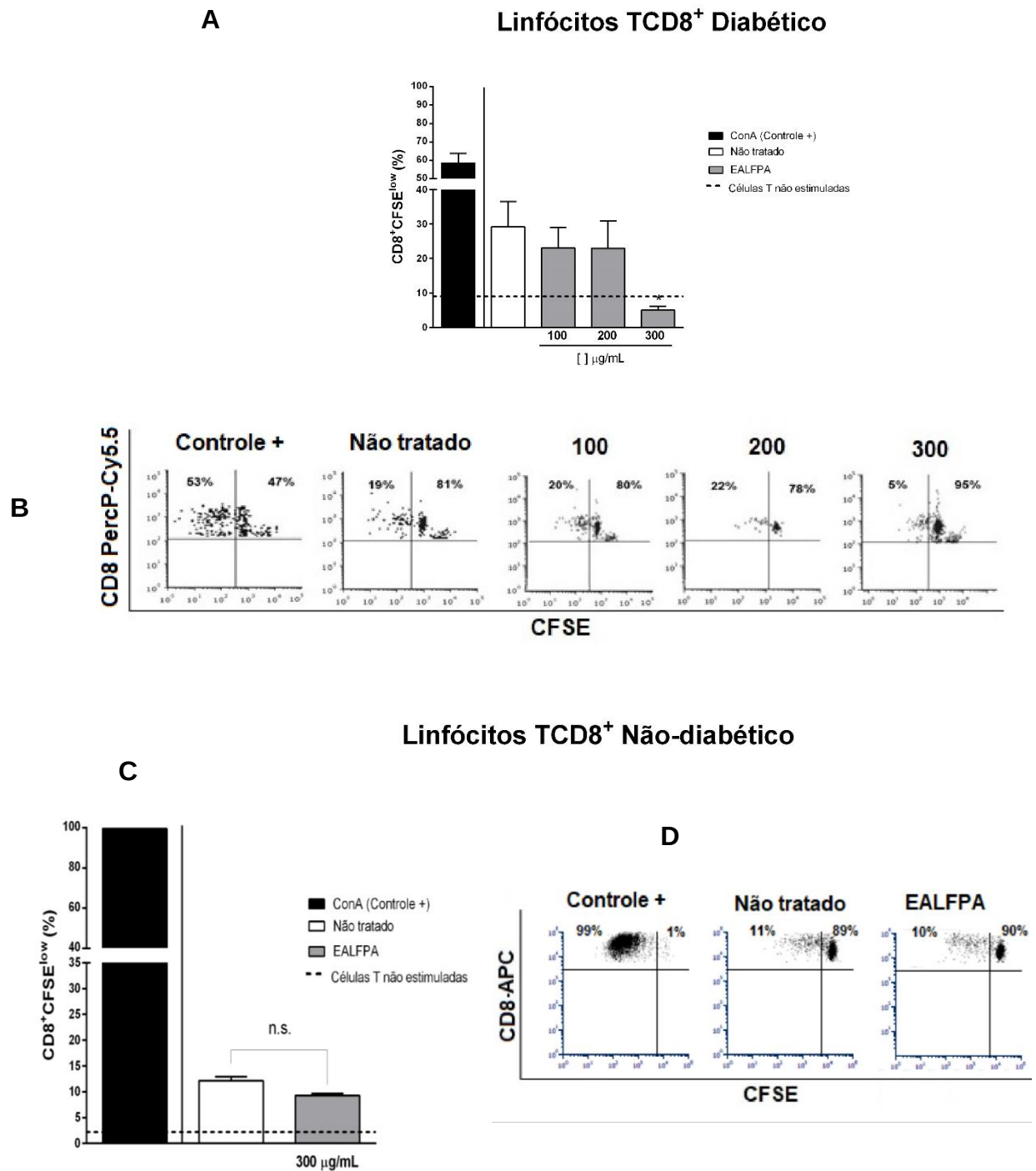


Gráfico 4: Proliferação de linfócitos T CD8 em culturas mistas (linfócitos, BM-APC e células MIN6 sob estresse) tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média±EPM de CD8⁺CFSE^{low} (população em proliferação de linfócitos T CD8⁺) de camundongos NOD diabéticos (A) e não diabéticos (C). As barras pretas representam as culturas submetidas ao mitógeno Concanavalina A (ConA: controle +), as barras brancas representam as culturas sem tratamento (NT), as barras cinzas são culturas tratadas com 100, 200 e 300 µg/mL de EALFPA nos camundongos diabéticos, e a barra cinza nos camundongos não diabéticos

tratada com 300 $\mu\text{g/mL}$ de EALFPA. A linha tracejada horizontal representa níveis basais de proliferação de células T não estimuladas. Os painéis B e D são gráficos de pontos mostrando o CFSE^{high} (superior direito, linfócitos T CD8⁺ não proliferativas) e CFSE^{low} (superior esquerdo, T CD8⁺ proliferativas) de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos, respectivamente. * $p < 0,05$ (n=15) em comparação com o grupo NT. Para a análise estatística utilizamos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Linfócitos T CD4⁺

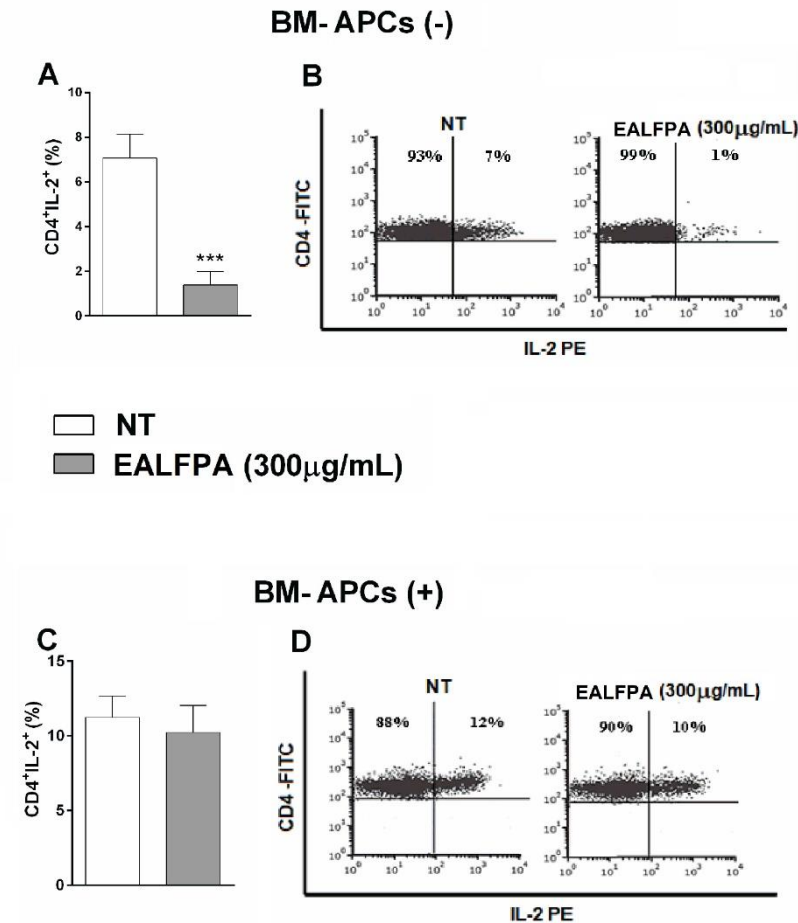


Gráfico 5: Detecção de IL-2 intracelular em linfócitos T CD4⁺ em culturas mistas (linfócitos T e células MIN6, estimuladas (+) ou não com BM-APCs (-), e tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média±EPM da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ que produzem citocina IL-2 não estimuladas (A) ou estimuladas (C) com BM-APCs. As culturas mistas, tratadas com 300 µg/mL de EALFPA (barras cinzas), foram comparadas com culturas não tratadas (NT – barras brancas). Os painéis B e D são gráficos de pontos representativos mostrando células T CD4⁺ IL-2⁺ (canto superior direito). ***p<0,0001 (n=15). Para a análise estatística utilizamos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Linfócitos T CD8⁺

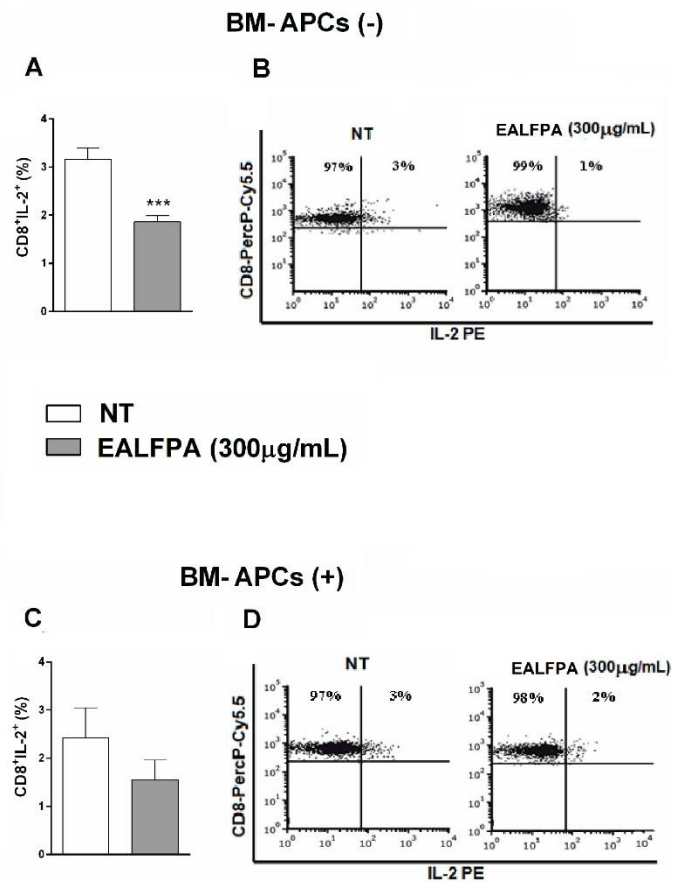


Gráfico 6: Detecção de IL-2 intracelular em linfócitos T CD8 em culturas mistas (linfócitos T e células MIN6, estimuladas (+) ou não com BM-APCs (-), e tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média±EPM da porcentagem de linfócitos T CD8 que produzem citocina IL-2 não estimuladas (A) ou estimuladas (C) com BM-APCs. As culturas mistas, tratadas com 300 µg/mL de EALFPA (barras cinzas), foram comparadas com culturas não tratadas (NT, barras brancas). Os painéis B e D são gráficos de pontos representativos mostrando células T CD8⁺ IL-2⁺ (canto superior direito). ***p<0,0001 (n=15). Para a análise estatística utilizamos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

5.3. Modulação de citocinas em culturas celulares mistas de linfócitos T de camundongos NOD com BM-APC e células MIN6 tratadas com EALFPA

Para avaliar o efeito do tratamento com EALFPA quantificamos a produção de citocinas pelas células apresentadoras nos sobrenadantes das culturas celulares mistas. Foram quantificadas as seguintes citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares como: IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17.

Como descrito anteriormente as culturas foram realizadas na ausência (-) (barra à esquerda) e presença (+) (barra à direita) de BM-APC. O gráfico 7 mostra a redução de IL-6 (Painel A) em comparação com culturas não tratadas com 300 μ g/mL de EALFPA em ambas as condições, ou seja, na ausência e na presença de BM-APC. IFN- γ (Painel C) apresentou o mesmo perfil. Quanto a produção de IL-10, a diminuição foi observada apenas em culturas na presença de BM-APC. Por outro lado, a produção e liberação, de TNF- α (Painel B) e IL17A (Painel E) não mostraram diferença entre as culturas tratadas com EALFPA e o grupo controle (NT) em nenhuma das condições testadas.

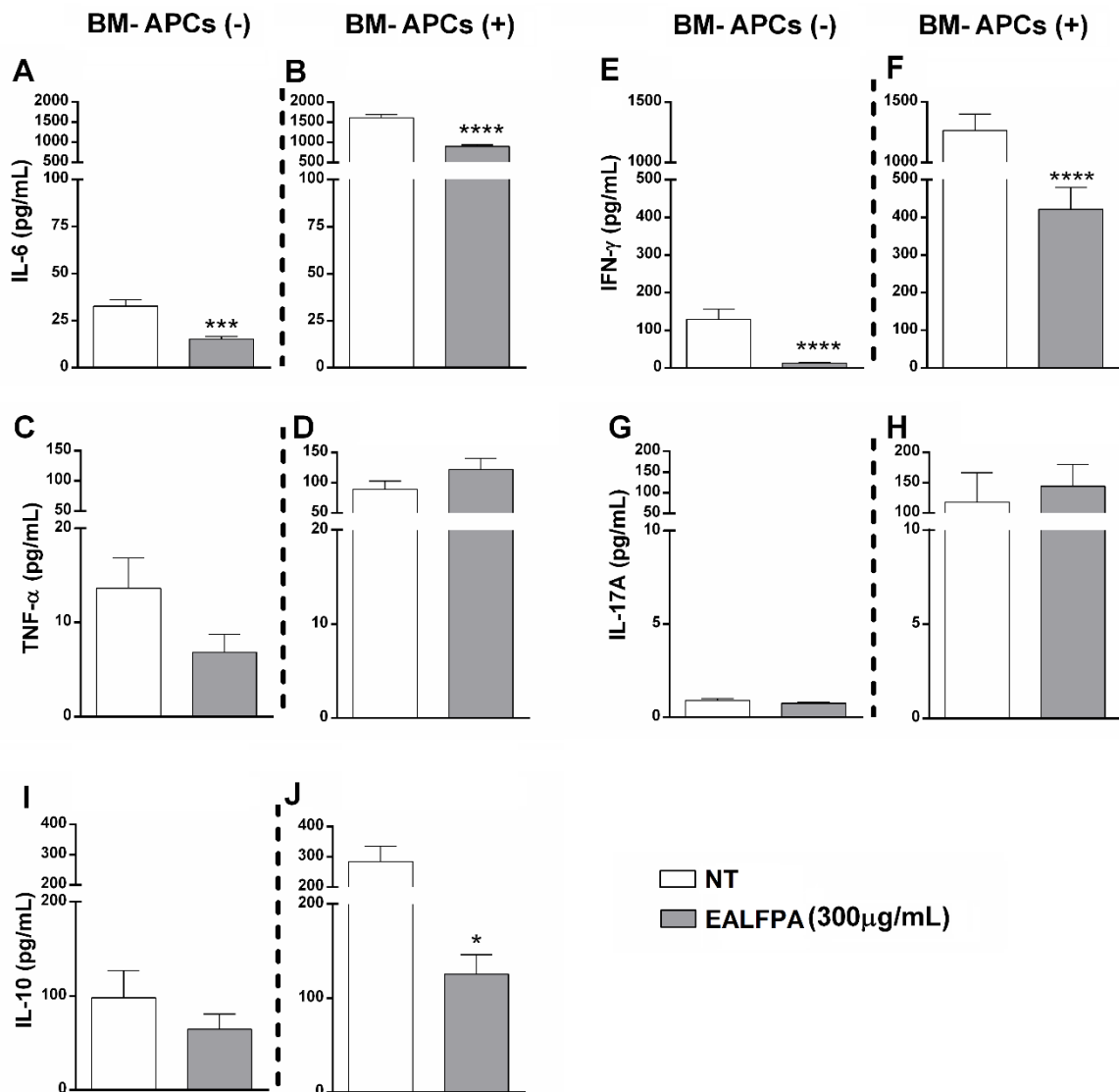


Gráfico 7: Quantificação de citocinas em sobrenadantes de culturas celulares mistas de linfócitos T de camundongos NOD e células MIN6 sob estresse, estimuladas (+) ou não estimuladas (-) com BM-APCs e tratadas com EALFPA. Os painéis representam a média±EPM das concentrações das citocinas: IL-6 (A e B), TNF-α (C e D), IFN-γ (E e F), IL-17A (G e H) e IL -10 (I e J) em sobrenadantes de culturas celulares mistas não estimuladas (BM-APCs -, barras esquerdas) ou estimuladas (BM-APCs +, barras direitas) tratadas com 300 μg/mL de EALFPA (barras cinzas) e no grupo controle (barras brancas). ****p<0,0001, *p<0,05 (n=15). Para este ensaio utilizamos a análise estatística com o Teste de Mann Whitney.

5.4. EALFPA induz Tregs CD25⁺ FoxP3⁺ em culturas mistas de linfócitos T de camundongos NOD com BM-APC e células MIN6 sob estresse

Como os linfócitos reguladores CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ exercem uma atividade essencial no controle dos linfócitos T autorreativos, analisamos a influência do tratamento com EALFPA na polarização de linfócitos T de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos para um perfil de Treg nas culturas mistas.

O Gráfico 8 mostra a frequência de células CD25⁺ FoxP3⁺ em linfócitos T CD4⁺ de camundongos NOD diabéticos (Painel B – mostrados nos quadrantes superiores direito) e não diabéticos (Painel D – nos quadrantes superiores direito). Como demonstra o Painel A, verificamos um aumento significativo dessas populações de linfócitos T reguladores nas culturas mistas tratadas com o EALFPA na concentração de 300 µg/mL em comparação com as culturas não tratadas ($5,38\% \pm 0,58$ vs $1,90\% \pm 0,29$; $p < 0,0001$). No entanto, em culturas celulares mistas com linfócitos T de camundongos NOD não diabéticos (painel C) não houve diferença estatística significativa na frequência de CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Tregs ao comparar culturas tratadas com EALFPA com não tratadas.

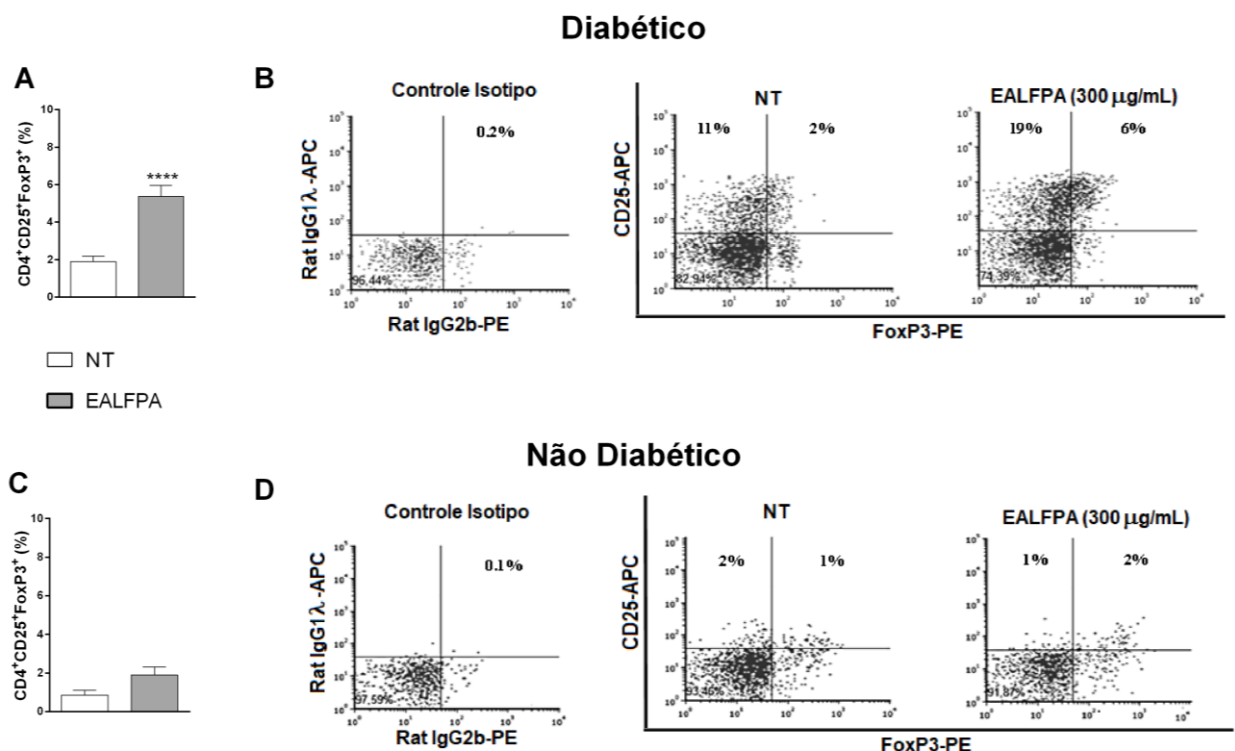


Gráfico 8: Frequência de CD25⁺Foxp3⁺ Tregs em linfócitos T CD4⁺ de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos em culturas celulares mistas compostas por linfócitos T, BM-APCs e células MIN6 sob estresse tratadas com EALFPA. Os painéis A e C representam a média±EPM das porcentagens de CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs em cultura celular mistas com

linfócitos T de camundongos NOD diabéticos (A) ou não diabéticos (C), tratados com 300 µg/mL de EALFPA (barras cinzas) ou não tratados (barras pretas). Os painéis B e D são gráficos de pontos representativos mostrando porcentagens de Tregs CD25⁺Foxp3⁺ (quadrante superior direito) na população de linfócitos T CD4⁺. ****p<0,0001 (n=15). Para este ensaio utilizamos a análise estatística Teste de Mann Whitney.

5.5. O EALFPA modula a expressão da molécula coestimuladora CD86 e da enzima IDO-1 *in vitro* em F4/80⁺ de culturas celulares compostas por BM-APC

Para avaliar o efeito modulador do tratamento do EALFPA em BM-APC realizamos ensaios de citometria de fluxo para analisar a expressão da molécula coestimuladora CD86 e da enzima IDO-1 em cultura mista de BM-APC com células MIN6, submetidas ou não ao tratamento de EALFPA nas doses de 100, 200 e 300 µg/mL. As análises foram realizadas na população positiva para o marcador F4/80⁺. Como mostra o Gráfico 9 – Painel A, observamos redução significativa da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) do fluorocromo associado ao anticorpo monoclonal anti-CD86 ao comparar com as culturas celulares não tratada ($149,40 \pm 13,15$), as culturas tratadas com EALFPA 200 µg/mL ($104,9 \pm 3,2$; *p<0,05) e 300 µg/mL ($101,1 \pm 4,67$; **p<0,01).

Por outro lado, ao analisar nesta mesma população a expressão da enzima IDO-1 (Gráfico 9 – Painel B), observamos aumento significativo de MFI do fluorocromo associado ao anticorpo monoclonal anti-IDO em culturas tratadas com EALFPA 200 µg/mL ($285,4 \pm 19,5$; *p<0,05) e 300 µg/mL ($319,0 \pm 27,21$, p<0,01) em comparação com células do grupo NT ($187,5 \pm 20,86$). Juntos esses resultados sugerem que o tratamento com EALFPA promove regulação negativa da molécula coestimuladora CD86 e a regulação positiva da enzima IDO-1 em BM-APC F4/80⁺.

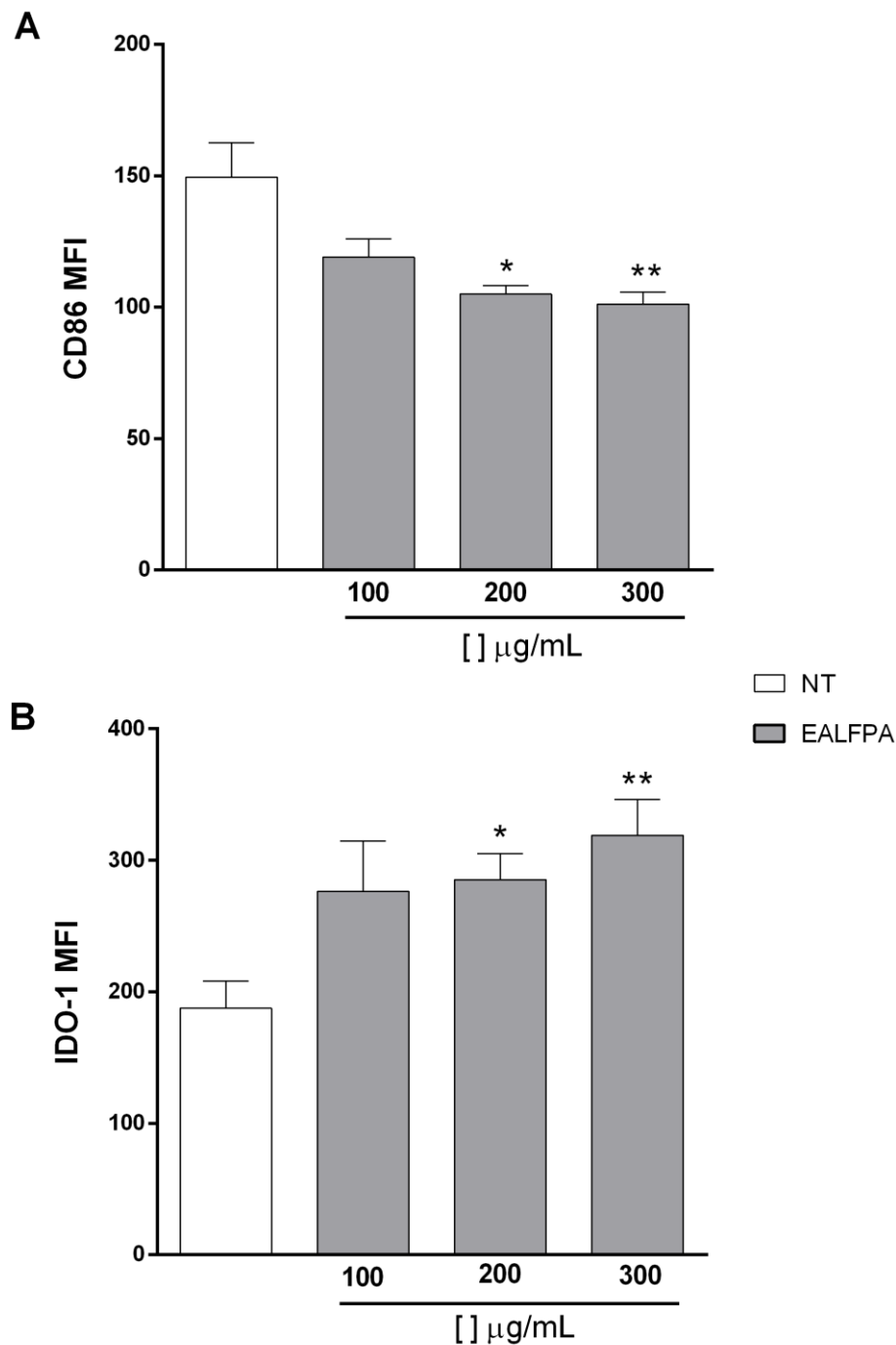


Gráfico 9: Expressão de CD86 e IDO-1 em F4/80⁺ BM-APCs tratadas *in vitro* com EALFPA. Os painéis A e B representam a média±EPM da mediana da intensidade de fluorescência do fluorocromo conjugado com anticorpos monoclonais direcionados à molécula coestimuladora CD86 (A) e enzima IDO-1 (B) em F4/80⁺ BM-APCs tratados (barras cinzas) ou não tratados (barras pretas) com 100, 200 e 300 µg/mL de EALFPA. *p<0,05; **p<0,01 (n=15), em comparação com o grupo NT. Para este ensaio utilizamos a análise estatística de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

6. DISCUSSÃO

A presença de antioxidantes em alimentos definidos como funcionais, tem sido alvo de pesquisas para fundamentar suas propriedades antiinflamatórias, antiproliferativas e seu potencial uso no suporte ao tratamento de doenças crônicas. Dessa forma, os compostos fenólicos presentes em alimentos funcionais como frutas e vegetais, podem prevenir ou controlar algumas doenças como: obesidade, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes, entre outras. Assim, a investigação das propriedades destes compostos fenólicos nessas doenças é atrativo e tem se tornado cada vez mais eficaz devido às suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, anticancerígenas e antimicrobianas (4, 5).

O DM-1 reduz a quantidade de antioxidantes endógenos no organismo, ocasionando o aumento de radicais livres que promovem danos teciduais (71). Os compostos antioxidantes provenientes da nossa alimentação podem ser uma alternativa no tratamento de doenças inflamatórias crônicas como o Diabetes mellitus.

O desenvolvimento do diabetes tipo 1 é resultado da destruição das células beta nas ilhotas pancreáticas por meio do processo inflamatório, onde as células apresentadoras de antígenos (APCs) expressam moléculas de MHC classe II/I e coestimulatórias que ativam clones específicos de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$. O aumento da geração de ROS intracelular estimula a ativação das células $TCD8^+$ levando ao efeito citotóxico com indução da produção de citocinas inflamatórias, FasL, perforinas e granzimas, consequentemente levando à morte das células beta (72, 73). O linfócito $TCD4^+$ produz e secreta várias citocinas, tais como interferon ($IFN\ \alpha$, β , γ), fator de necrose tumoral (TNF), IL-2, entre outras; onde atuam na proliferação e diferenciação de células inflamatórias como linfócitos $TCD8^+$ e macrófagos (74, 75). Esses linfócitos desencadeiam destruição seletiva das células beta pancreáticas, resultando na deficiência desse hormônio (74, 75). Sendo assim, os compostos antioxidantes provenientes da nossa alimentação podem ser uma fonte alternativa de moléculas que ajudam a bloquear os efeitos nocivos dos radicais livres gerados pela atividade das EROs e assim retardar a evolução do DM-1 (23, 76, 77).

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstramos, no modelo de camundongos NOD, que os compostos antioxidantes presentes no extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata* promovem diminuição na incidência do DM-1, redução do estresse oxidativo, apoptose das células beta pancreáticas e diminuição do infiltrado inflamatório (linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$) nas ilhotas pancreáticas (23, 24). Mostramos também que o EALFPA em culturas celulares *in vitro* promove a inibição da proliferação de linfócitos T submetidos à estimulação com o mitógeno conA (24).

Nesses estudos foram identificados pela técnica HPLC compostos fenólicos presentes nas folhas do extrato aquoso de *Passiflora alata*, dentre eles: isoorientina, vitexina, isovitexina, catequina, epicatequina e rutina. As ações sinérgicas entre esses compostos possuem efeito antioxidante e antiinflamatório, com modulação do processo inflamatório sobre as células beta pancreáticas.

Considerando as atividades biológicas dos compostos fenólicos encontrados, alguns estudos (76, 77) mostraram que a rutina tem a capacidade de eliminar os radicais livres, reduzir o estresse oxidativo e preservar as células beta pancreáticas, resultando em: aumento da secreção de insulina e controle da hiperglicemia. Jadhav *et al.*, 2012 (76), estudaram os efeitos hipoglicemiantes e antidiabéticos de quatro compostos fenólicos sendo eles: ácido elágico, quercetina, rutina e ácido bosvético em ratos diabéticos induzidos quimicamente com estreptozotocina; eles mostraram que a rutina tem atividade antioxidante superior aos outros três compostos fenólicos, onde o mecanismo de ação proposto advém do aumento da utilização periférica de glicose e a inibição da atividade transportadora de glicose para o intestino; e estes flavonoides podem estimular as células beta a liberarem mais insulina.

O uso da rutina no controle da inflamação também foi avaliado em estudo do efeito no processo inflamatório em protocolo experimental utilizando camundongos asmáticos expostos à fumaça do cigarro, e quando analisados o líquido de lavagem broncoalveolar mostraram o aumento de linfócitos Tregs (CD4⁺ CD25⁺), diminuição das populações de células Th17, sendo assim a rutina foi capaz de inibir efetivamente as citocinas inflamatórias e melhorar a função pulmonar nesses camundongos inibindo a hiperresponsividade das vias aéreas (AHR) (78).

Samarghandian *et al.*, 2017 (79) estudaram a catequina em ratos diabéticos induzidos quimicamente por estreptozotocina, e verificaram que a catequina também possui propriedade antidiabético aumentando efeito antioxidante e pelo controle do estresse oxidativo nestes animais.

Os linfócitos possuem papel de destaque no processo de insulite que ocorre nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD o que nos levou a estudar sua interação com célula apresentadora de antígeno (no caso células dendríticas) e também a ação dos compostos fenólicos presentes nas folhas de *P. alata*, promovendo a inibição da proliferação de linfócitos, sugerindo ação antiinflamatória e, a preservação das células beta pancreáticas (diminuindo a insulite).

No presente estudo foram utilizados camundongos fêmea NOD, diabéticos (com incidência de 80,8% da doença) e camundongos não diabéticos (glicemia abaixo de 250 mg/dL com 8 semanas de vida) como controle; os linfócitos destes camundongos foram submetidos à cultura celular. Sendo assim, estabelecemos um modelo de cultura celular mista composta por BM-APCs, células MIN6 sob estresse e linfócitos T de camundongos NOD

diabéticos e não diabéticos para avaliar, *in vitro*, os mecanismos imunomoduladores exercidos por EALFPA em DCs tolerogênicas, interferindo em sua capacidade de polarizar linfócitos T a fenótipos funcionais.

Primeiramente, avaliamos a resposta proliferativa dos linfócitos TCD4 e TCD8 nas co-culturas tratadas ou não com doses de EALFPA de 100, 200 e 300 µg/mL. Mostramos que o tratamento com 300 µg/mL poderia inibir a proliferação de células TCD4 e TCD8 de camundongos diabéticos (Gráficos 3 e 4 - Painéis A e E). No entanto, essa dose não afetou a proliferação de ambas as populações de linfócitos T obtidos em culturas celulares de camundongos não diabéticos (Gráficos 3 e 4 - Painéis C e G). E vimos também que a dose de 500 µg/mL apresentou efeito semelhante, mas a toxicidade impactou a viabilidade celular, sendo então essa concentração de EALFPA retirada das análises futuras.

A proliferação de linfócitos TCD4⁺ provenientes de camundongos não diabéticos foi semelhante à de camundongos diabéticos (Gráfico 3 - Painel A). Desta forma, algumas hipóteses referentes a esses achados, foram estabelecidos com base nos dados da literatura. Price *et al.*, 2014 (80) mostraram que os linfócitos T, portadores de TCR transgênico (BDC2.5) específico para o antígeno da célula β, quando transferidas para linhagens congênicas resistente a diabetes (camundongos NODidd3/5), obtiveram resultados semelhantes aos níveis de proliferação após estimulação com DCs apresentando antígenos de células β quando comparados com aquelas transferidas para camundongos NOD. Zhao *et al.*, 2019 (81). Ou seja, não encontraram diferenças na capacidade proliferativa e na sobrevivência de linfócitos efetores periféricos (TCD4⁺) ou populações Tregs comparando camundongos NOD com a linhagem de camundongos não diabéticos C57BL/6 (B6). Christianson *et al.*, 1993 (82); Füchtenbusch *et al.*, 2005 (83) e Verdaguer *et al.*, 1997 (84), mostraram que linfócitos específicos TCD4⁺ para determinado antígeno provenientes de células beta virgens (84) ou aquelas obtidas de camundongos NOD pré-diabéticos (82, 83), quando transferidos para camundongos NOD-SCID, induzem a doença diabética. Estes achados podem sugerir que a ativação dos linfócitos T está programada para responder aos antígenos das células β antes do início da progressão do diabetes (83), o que poderia explicar os níveis semelhantes de proliferação de linfócitos T obtidos de camundongos diabéticos e não diabéticos.

Especificamente considerando o efeito do EALFPA em linfócitos TCD4⁺ de camundongos diabéticos e não diabéticos, uma possível hipótese para explicar este achado relaciona-se ao aumento da atividade das espécies reativas de oxigênio em camundongos diabéticos NOD e ao efeito antioxidante e antiproliferativo do EALFPA. Previte *et al.*, 2017 (85) mostraram que a proliferação de linfócitos TCD4⁺ de camundongos NOD TCR transgênicos (BDC.2.5) depende da atividade de ROS e a eliminação de ROS durante a ativação interrompe linfócitos TCD4⁺ na fase do ciclo celular G0/G1, inibindo a expansão clonal. No entanto, esta hipótese deverá ser testada para confirmar o impacto das vias de

geração de ROS na proliferação de células TCD4⁺ em camundongos diabéticos e não diabéticos.

A presença de BM-APCs em culturas celulares mostrou que a produção de IL-2 permaneceu a mesma em ambas as populações de linfócitos T avaliadas (Gráficos 5 e 6). Esses dados poderiam reforçar que o efeito de EALFPA na redução de IL-2 seria observado apenas na ausência de BM-APCs. Essa observação deve ter estudos adicionais sobre o impacto dos polifenóis na sinalização de IL-2 de ativação e não ativação de linfócitos T por BM-APCs. Dados da literatura mostraram que compostos fenólicos como rutina (86) e epigallocatequina-3-galato (EGCG) (87) inibem a proliferação de linfócitos T ativadas por mitógenos, afetando a progressão do ciclo celular pela modulação de proteínas relacionadas ao ciclo celular (87) e induzindo a apoptose (86).

Por outro lado, Delvecchio *et al.*, 2015 (19) mostraram que os compostos polifenólicos, quercetina e piperina, causaram perfil molecular antiinflamatório nas DCs, o que leva a redução da capacidade de criar sinapse imunológica estável em linfonodos de drenagem e, conseqüentemente, prejudica a proliferação de linfócitos T. Corroborando com isso, Gong *et al.*, 2003 (88) mostraram que os antioxidantes quercetina e rutina, presentes nos extratos de tabaco, afetaram as APCs de potencial redox intracelular, interferindo em vias redox-sensíveis relacionadas à função de apresentação de antígenos dessas células. Assim, parece que os compostos polifenólicos do EALFPA podem afetar a resposta proliferativa de linfócitos T, modulando diretamente as vias de sinalização de ativação de linfócitos T e interferindo na capacidade das APCs de estimular estas células.

Para prosseguirmos com a investigação, avaliamos os níveis de citocinas secretadas pelos linfócitos nos sobrenadantes das culturas mistas. As citocinas apresentam papel importante no desenvolvimento e ativação de células imunes, influenciando na sinalização celular, principalmente em doenças inflamatórias e autoimunes (como no caso o DM-1). A insulite destrutiva ocasionada no DM-1 está associada a níveis elevados de citocinas Th1 (IL-2, IL-12 e IFN- γ) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- α) em modelos animais (89). A citocina IL-6 é considerada multifuncional, pois é secretada por linfócitos T e macrófagos para estimular a resposta imune durante a inflamação (90). Hundhausen *et al.*, 2016 (91), mostraram respostas aumentadas de linfócitos T à IL-6 em DM-1 devido ao aumento na expressão do receptor de IL6 (IL-6R) na célula. Estudo realizado em população de crianças com DM-1 mostrou aumento da citocina IL-6 sérica em comparação à controles saudáveis (92). A citocina IFN- γ é produzida por vários tipos de células sendo fundamental em diversos processos inflamatórios e considerada fator importante, juntamente com a IL-1 β , no desequilíbrio energético da célula beta e desenvolvimento do DM-1. Desta forma, o bloqueio destas citocinas poderia ser fator relevante no controle da inflamação do DM-1 (93).

Estudos provenientes do modelo experimental de DM-1 indicam que a insulite destrutiva do DM-1 está associada a mecanismos efetores pró-inflamatórios desencadeados por citocinas como IL-1 β IL-6, TNF- α , IFN- γ (89), bem como os produzidos pela população Th17 (94). Por outro lado, a IL-10 parece exercer papel protetor nos camundongos NOD, reduzindo a infiltração inflamatória nas ilhotas pancreáticas e inibindo a apoptose das células beta (95). Aqui, demonstramos que as culturas celulares mistas tratadas com 300 μ g/mL de EALFPA apresentaram redução na concentração de IL-6 em comparação com culturas não tratadas (Gráfico 7A e B). Corroborando com esses achados, Hosokawa *et al.*, 2010 (96), utilizando cultura de células de fibroblastos gengivais humanos derivados de periodontite crônica, mostraram que os polifenóis do chá verde, principalmente as catequinas como EGCG, foram capazes de reduzir a produção de IL-6 por meio da inibição da sinalização do fator de necrose tumoral superfamília 14 (TNFSF14).

Desta forma, observamos que o tratamento com EALFPA não modificou a produção de TNF- α nas culturas celulares mistas conforme demonstrado no Gráfico 7C e D. A literatura mostra dados conflitantes sobre a modulação do TNF- α por polifenóis em BM-APCs, apresentando efeito inibitório (19) ou estimulatório (22) na produção dessa citocina. Além disso, Ludewig et al., 1995 (97), mostraram que o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória importante na maturação e sobrevivência das DCs, camundongos deficientes em TNF não conseguem induzir a maturação completa de DCs. Assim, o equilíbrio entre a sinalização estimulatória e inibitória, derivada dos diferentes polifenóis presentes no EALFPA, poderia explicar parcialmente esses achados. Em relação à modulação de IL-10, mostramos sua redução nas culturas celulares mistas tratadas com EALFPA apenas quando BM-APCs estavam presentes (Gráfico 7I e J), o que contradiz parcialmente alguns achados da literatura (95). No entanto, alguns estudos apontam que a produção elevada de IL-10 observada em crianças e adultos com diabetes pode ser mecanismo compensatório em resposta ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (92, 98). Uma vez que EALFPA induz a redução das citocinas pró-inflamatórias de IL-6 e IFN- γ (Gráficos 7A e B – 7E e F, respectivamente), este mecanismo compensatório pode ter sido afetado.

Para melhorar o entendimento dos mecanismos imunomoduladores dos polifenóis, uma questão crucial está relacionada à capacidade de modificar o perfil maturacional das BM-APCs e, conseqüentemente, a polarização de linfócitos T antígeno-específicas. Nós mostramos que o tratamento com EALFPA induz ao perfil tolerogênico em BM-APCs, evidenciado pela regulação negativa da molécula coestimuladora CD86 (Gráfico 9A), seguida pela regulação positiva da enzima IDO-1 (Gráfico 9B), um marcador bem conhecido de APCs tolerogênicas (99). Essas BM-APCs tolerogênicas podem polarizar linfócitos TCD4⁺ para o perfil Treg, evidenciado pelo aumento da população de linfócitos

TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Gráfico 8). Uma vez que os camundongos NOD falharam na regulação da resposta imune, afetando a capacidade regulatória das APCs de ativar a população de linfócitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ e preservar a expressão ideal de Foxp3 nessas células, os efeitos imunomoduladores do EALFPA poderiam interferir nessa falha e retardar a progressão da doença autoimune. No entanto, investigações futuras das propriedades dos polifenóis na modulação das interações APC e linfócitos T reguladores devem ser estudadas. Além disso, também observamos uma redução significativa na produção de IFN- γ em culturas celulares mistas tratadas com EALFPA (Gráfico 7E e F) que sugerem inibição da diferenciação de células efectoras Th1.

Estudos recentes mostraram que as DCs podem participar da regulação do DM1, pois está relacionada à ação de linfócitos T autorreativos contra as células beta pancreáticas. A tolerância mediada por DCs pode ocorrer por meio da privação de DCs por aminoácidos essenciais por depleção dos níveis celulares de triptofano, produção de quinureninas; na qual são conhecidas por serem tóxicas para as células T pró-inflamatórias e indução de células T reguladoras.

A tolerância mediada por BM-APCs pode ocorrer em resposta à indução da enzima IDO-1, onde a sua atividade enzimática resulta na depleção do triptofano, induzindo a interrupção do ciclo celular e aumentando a apoptose das células T (11, 16).

Além disso, a atividade metabólica do IDO-1 gera quinureninas, que são conhecidas por serem seletivamente tóxicas para linfócitos T efetores, mas induzem a diferenciação de Tregs por meio da sinalização do receptor de hidrocarboneto aril (11, 16). Xie *et al.*, 2015 (100), usando modelo experimental camundongos machos doadores C57BL/6 (H2^b) e receptores BALB/c (H2^d) de transplante de intestino delgado alogênico, mostrou que as DCs com IDO superexpressas inibiram células efectoras e induziram a geração de linfócitos Treg Foxp3⁺. Jacques *et al.*, 2015 (101) concluíram que a tolerância imunológica que ocorre em resposta à indução da enzima IDO resulta na redução dos níveis celulares de triptofano e na produção de quinureninas (responsáveis por matar os linfócitos T pró-inflamatórias e induzirem a proliferação de linfócitos T reguladores). Desta forma, mostramos que EALFPA induziu BM-APCs a um perfil tolerogênico expressando a enzima IDO-1 (Gráfico 9B), influenciando a diferenciação de Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ em linfócitos T de camundongos NOD diabéticos, mas não em camundongos NOD não-diabéticos (Gráfico 8). Esses resultados podem indicar que essas BM-APCs tolerogênicas podem converter quinureninas eficientemente ativadas em um perfil Treg.

Sharma *et al.*, 2009 (102) mostraram que a expressão de IL-6 foi regulada pela atividade de IDO 1. Quando a IDO-1 estava ativa, a produção de IL-6 foi suprimida, sugestionando um mecanismo molecular chave pelo qual a IDO-1 mantém Treg é bloqueando a indução de IL-6 em DCs. Koorella *et al.*, 2014 (103) mostraram que a produção de IL-6 e

IDO-1 pelas DCs depende das mesmas vias de sinalização induzidas pelas moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, onde a produção de IL-6 inicia dentro de 4 horas após a estimulação em contraste com a ativação de IDO-1 que ocorre dentro de 24 horas. Corroborando com estes achados, mostramos que o tratamento com EALFPA induz a redução da expressão de CD86 (Gráfico 9A) e a produção de IL-6 (Gráfico 7 e B), associada a um aumento na expressão de IDO-1 (Gráfico 9B), após 96 horas de estimulação celular. Além disso, a supressão mediada por IL-6 pela expressão de IDO-1 parece crucial para prevenir a reprogramação de Treg em células próinflamatórias com o fenótipo Th-17 (104). No presente trabalho demonstramos uma frequência aumentada de Tregs em culturas tratadas com EALFPA (Gráfico 8), mas não há diferenças significativas na produção de IL-17A em comparação com culturas não tratadas (Gráfico 7G e H). Esses resultados podem ser parcialmente explicados pelo complexo equilíbrio das vias de diferenciação de quinureninas Tregs e Th-17, uma vez que as células de ambas as populações são diferenciadas a partir dos mesmos linfócitos TCD4⁺ virgens com estreita relação nas vias de diferenciação de ambos os fenótipos funcionais, permitindo uma transdiferenciação dessas populações em função dos estímulos microambientais (104, 105).

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho mostramos que o tratamento com o EALFPA pode induzir perfil tolerogênico nas BM-APC que podem polarizar quinureninas T ao perfil de Treg. Além disso, a redução significativa na produção da citocina IFN- γ em culturas celulares mistas tratadas poderia sugerir um efeito inibitório de EALFPA na diferenciação de células efetora Th1. Em conjunto, estes resultados fornecem uma compreensão adicional das propriedades imunomoduladoras dos polifenóis que compõe as folhas de *P. alata*, que podem representar um potencial candidato para apoiar o tratamento das respostas inflamatórias autoimunes, como no caso o DM-1.

O conjunto de nossos resultados contribuem para melhor compreensão das propriedades dos polifenóis presentes nas folhas de *P. alata* visando considerando efeitos antiinflamatórios e antiproliferativos, e translacionalidade para protocolos clínicos em doenças inflamatórias crônicas como o DM-1, entre outras.

8. REFERÊNCIAS

1. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(9):1247-52.
2. Wasserfall CH, Atkinson MA. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev*. 2006;5(6):424-8.
3. Filippi CM, Estes EA, Oldham JE, von Herrath MG. Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1515-23.
4. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, et al. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300(1):216-22.
5. Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. *Arthritis*. 2002;4(3):3-15.
6. TJLGS P. Jax Mice Database- NOD ShILtJ. <http://jaxmice.jax.org/strain/001976.html>. 2013.
7. Kikutani HMS. The Murine Autoimmune Diabetes Model: NOD and Related Strains. *Advances in immunology*. 1992;51:285-322.
8. Mark SBJA. The NOD Mouse: A Model of Immune. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:447-85.
9. Morel PA. Dendritic cell subsets in type 1 diabetes: friend or foe? *Front Immunol*. 2013;4:415.
10. Calderon B, Unanue ER. Antigen presentation events in autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(1):119-28.
11. Abram DM, Fernandes LGR, Ramos Filho ACS, Simioni PU. The modulation of enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase from dendritic cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:2171-8.
12. Jacques C. Mbongue DAN, Timothy W. Torrez, Nan-Sun Kim,, Langridge AFFaWHR. The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. *vaccines*. 2015;3:703-29.
13. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *The New England journal of medicine*. 1986;314(21):1360-8.
14. Odumosu O, Nicholas D, Payne K, Langridge W. Cholera toxin B subunit linked to glutamic acid decarboxylase suppresses dendritic cell maturation and function. *Vaccine*. 2011;29(46):8451-8.
15. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115-33.
16. Mbongue JC, Nieves HA, Torrez TW, Langridge WH. The Role of Dendritic Cell Maturation in the Induction of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Front Immunol*. 2017;8:327.
17. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
18. Wang GY, Chen GH, Li H, Huang Y, Zhang J, Jiang N, et al. Rapamycin inhibits activator protein-1 but not nuclear factor-kappaB activity of mature bone marrow-derived dendritic cells. *Transplant Proc*. 2010;42(5):1881-3.
19. Delvecchio FR, Vadrucchi E, Cavalcanti E, De Santis S, Kunde D, Vacca M, et al. Polyphenol administration impairs T-cell proliferation by imprinting a distinct dendritic cell maturational profile. *Eur J Immunol*. 2015;45(9):2638-49.
20. Fevery S, Billiau AD, Sprangers B, Rutgeerts O, Lenaerts C, Goebels J, et al. CTLA-4 blockade in murine bone marrow chimeras induces a host-derived antileukemic effect without graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2007;21(7):1451-9.
21. Kim GY, Cho H, Ahn SC, Oh YH, Lee CM, Park YM. Resveratrol inhibits phenotypic and functional maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *International immunopharmacology*. 2004;4(2):245-53.
22. Rogers J, Perkins I, van Olphen A, Burdash N, Klein TW, Friedman H. Epigallocatechin gallate modulates cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells stimulated with

- lipopolysaccharide or muramyl dipeptide, or infected with *Legionella pneumophila*. *Exp Biol Med* (Maywood). 2005;230(9):645-51.
23. Colomeu TC, Figueiredo D, Cazarin CB, Schumacher NS, Marostica MR, Jr., Meletti LM, et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *International immunopharmacology*. 2014;18(1):106-15.
 24. Figueiredo D, Colomeu TC, Schumacher NSG, Stivanin-Silva LG, Cazarin CBB, Meletti LMM, et al. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). *International immunopharmacology*. 2016;35:127-36.
 25. Eisenbarth GS. Banting Lecture 2009: An unfinished journey: molecular pathogenesis to prevention of type 1A diabetes. *Diabetes*. 2010;59(4):759-74.
 26. Pavin EJ, Zollner RL. 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 Endo Metabol*. 1994;38:105-8.
 27. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(8):610-21.
 28. Nikolic T, Bunk M, Drexhage HA, Leenen PJ. Bone marrow precursors of nonobese diabetic mice develop into defective macrophage-like dendritic cells in vitro. *Journal of immunology*. 2004;173(7):4342-51.
 29. Gaudreau S, Guindi C, Menard M, Benabdallah A, Dupuis G, Amrani A. GM-CSF induces bone marrow precursors of NOD mice to skew into tolerogenic dendritic cells that protect against diabetes. *Cellular immunology*. 2010;265(1):31-6.
 30. Harden JL, Egilmez NK. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunological investigations*. 2012;41(6-7):738-64.
 31. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transpl Immunol*. 2006;17(1):58-60.
 32. Pallotta MT, Orabona C, Bianchi R, Vacca C, Fallarino F, Belladonna ML, et al. Forced IDO1 expression in dendritic cells restores immunoregulatory signalling in autoimmune diabetes. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014;18(10):2082-91.
 33. Song SS, Yuan PF, Chen JY, Fu JJ, Wu HX, Lu JT, et al. TGF-beta favors bone marrow-derived dendritic cells to acquire tolerogenic properties. *Immunological investigations*. 2014;43(4):360-9.
 34. Weaver DJ, Jr., Poligone B, Bui T, Abdel-Motal UM, Baldwin AS, Jr., Tisch R. Dendritic cells from nonobese diabetic mice exhibit a defect in NF-kappa B regulation due to a hyperactive I kappa B kinase. *Journal of immunology*. 2001;167(3):1461-8.
 35. Okubo Y, Torrey H, Butterworth J, Zheng H, Faustman DL. Treg activation defect in type 1 diabetes: correction with TNFR2 agonism. *Clin Transl Immunology*. 2016;5(1):e56.
 36. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12(4):431-40.
 37. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212:8-27.
 38. Wu AJ, Hua H, Munson SH, McDevitt HO. Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12287-92.
 39. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, Seu L, et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med*. 2010;2(32):32ra6.
 40. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods*. 1999;223(1):77-92.
 41. Na YR, Jung D, Gu GJ, Seok SH. GM-CSF Grown Bone Marrow Derived Cells Are Composed of Phenotypically Different Dendritic Cells and Macrophages. *Mol Cells*. 2016;39(10):734-41.

42. Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, et al. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia*. 1993;36(11):1139-45.
43. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1011:168-76.
44. Nakashima K, Kanda Y, Hirokawa Y, Kawasaki F, Matsuki M, Kaku K. MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones. *Endocr J*. 2009;56(1):45-53.
45. Hohmeier HE, Newgard CB. Cell lines derived from pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;228(1-2):121-8.
46. Hribal ML, Perego L, Lovari S, Andreozzi F, Menghini R, Perego C, et al. Chronic hyperglycemia impairs insulin secretion by affecting insulin receptor expression, splicing, and signaling in RIN beta cell line and human islets of Langerhans. *FASEB J*. 2003;17(10):1340-2.
47. Maestre I, Jordan J, Calvo S, Reig JA, Cena V, Soria B, et al. Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology*. 2003;144(1):335-45.
48. Minami K, Yano H, Miki T, Nagashima K, Wang CZ, Tanaka H, et al. Insulin secretion and differential gene expression in glucose-responsive and -unresponsive MIN6 sublines. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(4):E773-81.
49. Skelin M, Rupnik M, Cencic A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX*. 2010;27(2):105-13.
50. Finkel THN. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408:239-47.
51. Gardner CDES, Reynolds, C.M, Eguchi, K, Frank, G.D, Motley, E.D. Hydrogen Peroxide Inhibits Insulin Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2003;228:836-42.
52. Valko MLD, Mancol, J, Cronin, M.T.D, Mazur, M, Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39:44-84.
53. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2005;1:1-7.
54. Temple NJ. Antioxidants and Disease: More Question Than Answers. *Nutrition Research*. 2000;20(3):449-59.
55. Maritim A C SRA, Watkins III J B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Molecular Toxicology*. 2002;17(1):24-38.
56. Colic M, Pavelic, K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *JMolMed*. 2000;78:333-6.
57. Tedesco I, RUSSO, M, Russo, P, Iacomino, G, Russo, G.L, Carraturo, A, Faruolo, C, Moio, L, Palumbo, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *Journal Nutrition Biochem*. 2000;11:114-9.
58. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine*. 2000;17:171-80.
59. Lapidot T, Walker, M.D, Kanner, J. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic B-Cells in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50:7220-5.
60. Meletti L M M SRRD MK. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar 'COMPOSTO IAC-27'. *Scientia Agricola*. 2000;57(491-498).
61. Zeraik MLP PC Z, VG, Yariwake JH. Maracujá: um alimento funcional? *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010;20(3):459-71.
62. Bernacci LCMLMM, Soares-Scott, M.D, da Silva Passos, I.R. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. *Embrapa Cerrados*. 2005;1(22):559-86.
63. Sousa JSIMLMM. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. *FEALq*. 1997:179.
64. Silva JK, Cazarin, C.B.B, Colomeu, T.C, Batista, A.G, Meletti, L.M.M, Paschoal, J.A.R, Bogusz-Jr, S, Furlan, M.F, Reys, F.G.R, Augusto, F, Maróstica-Jr, R, Zollner, R.L. Antioxidant activity of aqueous extract

- of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. Food Research international. 2013;13.
65. Dhawan K, Dhawan, S, Sharma, A. *Passiflora*: a review update. Journal of ethnopharmacology. 2004;94:1-23.
 66. Gosmann G, Provensi, G, Comunello, L.N, Rates, S.M.K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Plassifloraceae) Revista Brasileira de Biociências. 2011;9(1):88-99.
 67. Colomeu TC, de Figueiredo D, de Matos da Silva P, Fernandes LGR, Zollner RL. Antiproliferative and Pro-Oxidant Effect of Polyphenols in Aqueous Leaf Extract of *Passiflora alata* Curtis on Activated T Lymphocytes from Non-Obese Diabetic (NOD SHILT/J) Mice. Antioxidants (Basel). 2022;11(8).
 68. Henry C, Chen, Y.U, Stout, R, Swain, S.L. Cell separation: Nylon wool. In: Mishell BB, Shiigi SM. Selected Methods in Cellular Immunology. 1980:182-5.
 69. Lyons AB, Blake SJ, Doherty KV. Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. Curr Protoc Cytom. 2013;Chapter 9:Unit9 11.
 70. Pessato TB, de Carvalho NC, de Figueiredo D, Colomeu TC, Fernandes LGR, Netto FM, et al. Complexation of whey protein with caffeic acid or (-)-epigallocatechin-3-gallate as a strategy to induce oral tolerance to whey allergenic proteins. International immunopharmacology. 2019;68:115-23.
 71. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabet Med. 2000;17(3):171-80.
 72. Chen J, Stimpson SE, Fernandez-Bueno GA, Mathews CE. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Type 1 Diabetes. Antioxid Redox Signal. 2018;29(14):1361-72.
 73. Wong FS, Janeway CA, Jr. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. Res Immunol. 1997;148(5):327-32.
 74. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia Celular e Molecular. . 2007;6ªedição.
 75. Seissler J, Scherbaum WA. Are we ready to predict and prevent endocrine/organ specific autoimmune diseases? Springer Semin Immunopathol. 2002;24(3):273-95.
 76. Jadhav R, Puchchakayala G. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012;4(2):251-6.
 77. Stanley Mainzen Prince P, Kamalakkannan N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. J Biochem Mol Toxicol. 2006;20(2):96-102.
 78. Liu LL, Zhang Y, Zhang XF, Li FH. Influence of rutin on the effects of neonatal cigarette smoke exposure-induced exacerbated MMP-9 expression, Th17 cytokines and NF-kappaB/iNOS-mediated inflammatory responses in asthmatic mice model. Korean J Physiol Pharmacol. 2018;22(5):481-91.
 79. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Catechin Treatment Ameliorates Diabetes and Its Complications in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Dose Response. 2017;15(1):1559325817691158.
 80. Price JD, Beauchamp NM, Rahir G, Zhao Y, Rieger CC, Lau-Kilby AW, et al. CD8+ dendritic cell-mediated tolerance of autoreactive CD4+ T cells is deficient in NOD mice and can be corrected by blocking CD40L. J Leukoc Biol. 2014;95(2):325-36.
 81. Zhao Y, Alard P, Kosiewicz MM. High Thymic Output of Effector CD4(+) Cells May Lead to a Treg : T Effector Imbalance in the Periphery in NOD Mice. J Immunol Res. 2019;2019:8785263.
 82. Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. Diabetes. 1993;42(1):44-55.
 83. Fuchtenbusch M, Larger E, Thebault K, Boitard C. Transfer of diabetes from prediabetic NOD mice to NOD-SCID/SCID mice: association with pancreatic insulin content. Horm Metab Res. 2005;37(2):63-7.
 84. Verdaguer J, Schmidt D, Amrani A, Anderson B, Averill N, Santamaria P. Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice. J Exp Med. 1997;186(10):1663-76.

85. Previte DM, O'Connor EC, Novak EA, Martins CP, Mollen KP, Piganelli JD. Reactive oxygen species are required for driving efficient and sustained aerobic glycolysis during CD4+ T cell activation. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175549.
86. Roseghini R, Rocha DS, Clarencio J, Costa SL, Costa MF, Tardy M, et al. Flavonoid rutin alters the viability and function of mitogen-stimulated splenocytes and thymocytes compared with non stimulated cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2007;29(2):271-85.
87. Wu D. Green tea EGCG, T-cell function, and T-cell-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Investig Med*. 2016;64(8):1213-9.
88. Gong J, Chen SS. Polyphenolic antioxidants inhibit peptide presentation by antigen-presenting cells. *International immunopharmacology*. 2003;3(13-14):1841-52.
89. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 1998;14(2):129-51.
90. Gomes KB. IL-6 and type 1 diabetes mellitus: T cell responses and increase in IL-6 receptor surface expression. *Ann Transl Med*. 2017;5(1):16.
91. Hundhausen C, Roth A, Whalen E, Chen J, Schneider A, Long SA, et al. Enhanced T cell responses to IL-6 in type 1 diabetes are associated with early clinical disease and increased IL-6 receptor expression. *Sci Transl Med*. 2016;8(356):356ra119.
92. He JS, Xie PS, Luo DS, Sun CJ, Zhang YG, Liu FX. Role of immune dysfunction in pathogenesis of type 1 diabetes mellitus in children. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(10):823-6.
93. Driver JP, Racine JJ, Ye C, Lamont DJ, Newby BN, Leeth CM, et al. Interferon-gamma Limits Diabetogenic CD8(+) T-Cell Effector Responses in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2017;66(3):710-21.
94. Liu SM, Lee DH, Sullivan JM, Chung D, Jager A, Shum BO, et al. Differential IL-21 signaling in APCs leads to disparate Th17 differentiation in diabetes-susceptible NOD and diabetes-resistant NOD.Ldd3 mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(11):4303-10.
95. Li C, Zhang L, Qiao L, Hu S, Ge J, Hu C, et al. Combination therapy with anti-CD20 mAb and IL-10 gene to reverse type 1 diabetes by attenuating pancreatitis and inhibiting apoptosis in NOD mice. *Life Sci*. 2020;256:117985.
96. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T. Tea polyphenols inhibit IL-6 production in tumor necrosis factor superfamily 14-stimulated human gingival fibroblasts. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54 Suppl 2:S151-8.
97. Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA, Pauli G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol*. 1995;25(7):1943-50.
98. Weaam Gouda LM, Soha M. Abd El Dayem , Esmat Ashour and Mie Afify. Evaluation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in type 1 diabetes mellitus. 2018;42:14:1-6.
99. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(10):762-74.
100. Xie FT, Cao JS, Zhao J, Yu Y, Qi F, Dai XC. IDO expressing dendritic cells suppress allograft rejection of small bowel transplantation in mice by expansion of Foxp3+ regulatory T cells. *Transpl Immunol*. 2015;33(2):69-77.
101. Mbongue JC, Nicholas DA, Torrez TW, Kim NS, Firek AF, Langridge WH. The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. *Vaccines (Basel)*. 2015;3(3):703-29.
102. Sharma MD, Hou DY, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*. 2009;113(24):6102-11.
103. Koorella C, Nair JR, Murray ME, Carlson LM, Watkins SK, Lee KP. Novel regulation of CD80/CD86-induced phosphatidylinositol 3-kinase signaling by NOTCH1 protein in interleukin-6 and indoleamine 2,3-dioxygenase production by dendritic cells. *J Biol Chem*. 2014;289(11):7747-62.
104. Baban B, Chandler PR, Sharma MD, Pihkala J, Koni PA, Munn DH, et al. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *Journal of immunology*. 2009;183(4):2475-83.

105. Gagliani N, Amezcu Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 2015;523(7559):221-5.

ANEXO I



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

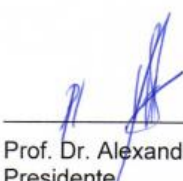
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Modulação da resposta inflamatória sobre células dendríticas tolerogênicas da medula óssea de camundongos NOD/Shilt tratados com o extrato aquoso de Passiflora alata." (protocolo nº 3653-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner / Nayara Simon Gonzalez Schumacher, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

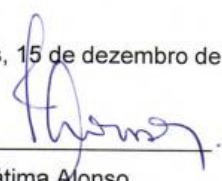
A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **15 de dezembro de 2014**.

Campinas, 15 de dezembro de 2014.



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO II



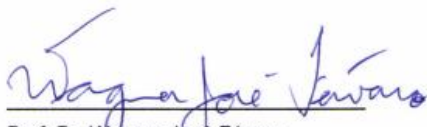
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Modulação da resposta inflamatória sobre células dendríticas tolerogênicas da medula óssea de camundongos NOD Shlt/J tratados com o extrato aquoso de Passiflora alata**, registrada com o nº **5077-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner e Nayara Simon Gonzalez Schumacher**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **29 de novembro de 2018**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/03/2015-15/03/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	29/11/2018-15/03/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / NOD/ShiLtJ
No. de animais:	35
Idade/Peso:	04 semanas / 20 g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Laboratório de Imunologia Translacional, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 19 de dezembro de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente


Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência; O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO III

Cytokine 152 (2022) 155832



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine

Aqueous extract of *Passiflora alata* leaves modulates in vitro the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and CD86 expression in bone marrow-derived professional antigen-presenting cells polarizing NOD mice T cells to a Treg profile

Nayara Simon Gonzalez Schumacher¹, Luís Gustavo Romani Fernandes¹,
Ricardo de Lima Zollner^{*}

Laboratory of Translational Immunology, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13083-888, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Type 1 diabetes mellitus

NOD mice

Antigen-presenting cells and *Passiflora alata*

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) and macrophages are professional antigen-presenting cells (pAPCs), numerous in the pancreas of nonobese diabetic (NOD) mice and playing an essential role in the autoimmune response of type 1 diabetes. The expression of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a critical factor for the tolerogenic activity of pAPCs, acting in the catabolism of tryptophan, providing metabolites that suppress the T cell effectors and induce T regulatory cells differentiation. Here we investigated the in vitro mechanisms of lyophilized aqueous extract from *Passiflora alata* leaves (LAEPAL) that modulates bone marrow-derived professional antigen-presenting cells (BM-pAPCs), affecting their ability to polarize T cells. A cell culture model was defined using mixed cultures of BM-pAPCs and T lymphocytes NOD mice with stressed MIN-6 cells as a source of pancreatic β cells antigens. We showed that the treatment with 300 $\mu\text{g/mL}$ of LAEPAL induces a significant decrease in the CD4 and CD8 T effector lymphocytes proliferation from diabetic but not in non-diabetic mice, followed by a reduction of the IL-6 and IFN- γ cytokines release in the cell cultures supernatants. Moreover, we observed an increase of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs in the cell cultures from diabetic mice. These results could be partially explained by the LAEPAL modulatory effects in BM-pAPCs, downregulating the CD86 co-stimulatory molecule expression, and increasing IDO-1 expression in F4/80⁺ BM-pAPCs. These results contribute to a better understanding of the polyphenols' immunomodulatory properties, meaning they could induce tolerogenic antigen-presenting cells, which could polarize T cells to a Treg profile and decrease the activity of CD4⁺ and CD8⁺ T effector cells.