



**TERESIAMA VELIKKAKAM**

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATO  
BRUTO DE *Necator americanus* EM CAMUNDONGOS COM  
DIABETES *MELLITUS* TIPO 1**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Julho/2018

**TERESIAMA VELIKKAKAM**

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATO  
BRUTO DE *Necator americanus* EM CAMUNDONGOS COM  
DIABETES *MELLITUS* TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>: Walderez Ornelas Dutra.  
Co-orientadora Dra. Soraya Torres Gaze.

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Julho/2018

## AGRADECIMENTOS

A priori, gostaria de agradecer à pesquisadora, e minha mestre, doutora Soraya Gaze, pela orientação, pela paciência, pela doçura ao me ensinar tantas coisas.

Naturalmente, não poderia deixar de agradecer à minha orientadora doutora Walderéz Ornelas Dutra por ter me acolhido e confiado no meu trabalho.

Agradeço aos professores Ricardo Fujiwara e Marcelo Pascoal pelas colaborações.

Obrigada meus amigos Camila Salles, Stella Colombarolli, Jorge Goulart, Anna Carolina Figueiredo, Eneida Santos e Izabella Andrade por em tantos dias inventarem de me fazer feliz, simplesmente sendo as pessoas fantásticas que são. Agradeço ainda, pelo exemplo individual de profissionalismo e por sempre estarem prontos a me ajudar, dentro e fora da bancada.

Pelo exemplo de profissionalismo, pelo preciosismo acadêmico e pelo coração enorme, Érica Alves, obrigada!

Por tudo que me ensinou e por toda paciência em mim investida, obrigada Jacqueline Fiuza!

Agradeço ainda, aos demais pesquisadores e equipe do ICM, em especial ao Vitor Hugo e Nayara Ingrid, por todos os ensinamentos.

Bruna Garzedim, obrigada por somar tanto a minha trajetória, com seu sopro de entusiasmo e positividade.

Aos professores do Departamento de Morfologia, obrigada por contribuir com minha formação.

Obrigada, Jôsy Hubner e Rebecca Vasconcelos por deixarem de viver, e navegarem comigo em noites infundáveis, e outras mais agradáveis, de artigos e trabalhos, mas também de diversão, amizade e conhecimentos variados.

Incluo neste agradecimento, um obrigado especial, à minha amiga Jéssica Machado. Obrigada pela pessoa que você, e conseqüentemente, por todo amor que me deu. Não caberia aqui tudo que me ensinou!

Não menos importante, obrigada Felícia, minha irmã mais nova e mais sábia, que nunca me deixou desistir.

Obrigada Vinicius Santos, meu companheiro de vida, por ser tão doce e me dar tanto suporte.

Obrigado pai, obrigada mãe! Obrigada por sempre estarem comigo e pelos sacrifícios que fazem por mim e pela minha educação.

*"Conhece-te a si mesmo."*

Sócrates

## RESUMO

A diabetes tipo 1 é uma doença autoimune marcada por altos níveis de glicose no sangue, devido à destruição de células- $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina. A Hipótese da Higiene faz associação entre o aumento da incidência de doenças autoimunes e uma diminuição do contato com agentes infecciosos e parasitários na infância. A hipótese desse trabalho é que a exposição a produtos do helminto *Necator americanus* poderia modular a resposta imunológica de camundongos com diabetes autoimune e melhorar o quadro característico da doença. No bioensaio foram utilizados 30 camundongos fêmeos, da linhagem Non-obese diabetic (NOD). Os animais foram separados em dois grupos com 15 indivíduos cada: o grupo AdEX foi tratado com extrato bruto de *N. americanus*, e o grupo controle foi tratado com solução inócua (PBS). As respectivas soluções foram administradas por via intraperitoneal, três vezes por semana. Semanalmente, a glicose foi aferida, e uma gota de sangue foi retirada da cauda para confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo. Após 18 semanas de tratamento os animais foram eutanasiados e o sangue foi colhido. Também foram colhidos o baço e o pâncreas. O sangue foi centrifugado e o soro estocado para futuras análises das citocinas através de citometria de fluxo. Também foram feitos cortes histológicos do pâncreas para posterior comparação do infiltrado inflamatório. A resposta frente ao extrato bruto do helminto foi avaliada comparando os resultados entre os grupos nas técnicas: leucometria total e relativa, avaliação do perfil de citocinas e de células do sistema imunológicos presentes no baço, níveis de glicose dos animais e avaliação do infiltrado inflamatório. Os resultados obtidos mostraram uma tendência de imunomodulação pelo extrato administrado. Na correlação entre citocinas e glicemia, foi observado que maiores quantidades de IL-4 e IL-10 refletiam em menores taxas de glicemia nos animais do grupo tratado com extrato bruto. Assim, conclui-se que a administração de antígenos de *N. americanus* em camundongos com diabetes autoimune é capaz de modificar aspectos da resposta imunológica, e potencialmente induzir a uma produção de citocinas de perfil de resposta Th2 e/ou modulatória. Entretanto, a produção dessas citocinas mostrou-se incapaz de impedir a infiltração de células imunológicas no pâncreas, mas podendo aparentemente atrasar a progressão da inflamação. Para um melhor entendimento do panorama imunológico da DM1 em modelo experimental NOD tratado com extrato bruto de *N. americanus* faz-se necessários futuros experimentos.

**Palavras-chave:** Diabetes tipo 1, Imunomodulação, *Necator americanus*, Hipótese da Higiene.

## ABSTRACT

Type 1 diabetes is an autoimmune disease marked by high blood glucose levels due to the destruction of insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells. Hygiene Hypothesis is an association between the increase in the incidence of autoimmune diseases and a decrease in contact with infectious and parasitic agents in childhood. The hypothesis of this work is that exposure to products of the hookworm *Necator americanus* could modulate the immune response of mice with autoimmune diabetes and improve the disease's characteristic picture. In the bioassay were used 30 female mice of the non-obese diabetic (NOD) lineage. The animals were separated into two groups with 15 individuals each: the AdEX group was treated with crude extract of *N. americanus*, and the control group was treated with innocuous solution (PBS). The respective solutions were given intraperitoneally three times a week. The glucose was measured weekly, and a drop of blood was removed from the tail to make blood smear blades. After 18 weeks of treatment the animals were euthanized and blood was collected. The spleen and pancreas were also collected. Blood was centrifuged and serum stored for future cytokine analysis by flow cytometry. Histological sections of the pancreas were also made for later comparison of the inflammatory infiltrate. The response to the crude helminth extract was evaluated by comparing the results between the groups in the techniques: total and relative leucometry, evaluation of the cytokine profile and immunological system cells present in the spleen, glucose levels of the animals and evaluation of the inflammatory infiltrate. The obtained results showed a trend of immunomodulation by the administered extract. In the correlation between cytokines and glycemia, it was observed that higher amounts of IL-4 and IL-10 reflected in lower glycemia rates in the animals treated with crude extract. Thus, it is concluded that the administration of *N. americanus* antigens in mice with autoimmune diabetes is capable of modifying aspects of the immune response, and potentially inducing a production of Th2 and / or modulatory response profile cytokines. However, the production of these cytokines proved to be incapable of preventing the infiltration of immune cells into the pancreas, but could appear to delay the progression of inflammation. For a better understanding of the immunological panorama of DM1 in the NOD experimental model treated with crude extract of *N. americanus*, future experiments are necessary.

**Keywords:** Type 1 Diabetes, Immunomodulation, *Necator americanus*, Hygiene Hypothesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquemas experimentais adotados para obtenção de extrato bruto de <i>N. americanus</i> e Tratamento semanal dos animais NOD.....	39
Figura 2 - Painel de seções pancreáticas com enfoque nas ilhotas .....	49
Figura 3 - Heatmap dos valores de percentil de glicemia.....	51
Figura 4 - Curva dos valores de glicemia mensurados semanalmente.. .....	52
Figura 5 - Efeito do tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> em camundongos NOD em linfócitos circulantes.. .....	53
Figura 6 - Efeito do tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> em camundongos NOD em eosinófilos circulantes.....	54
Figura 7 - - Efeito do tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> em camundongos NOD em leucócitos circulantes .....	55
Figura 8 - Tratamento com extrato bruto aumenta número de linfócitos T CD4+ produtores de IL-4 e IL-10.....	56
Figura 9 - Tratamento com extrato bruto aumenta número de linfócitos T CD4+CD25+ produtores de IL-4 e IL-10.....	57
Figura 10 - Tratamento com extrato bruto aumenta número de linfócitos T CD8+ produtores de IL-4 e IL-10.....	57
Figura 11 - Tratamento com extrato bruto aumenta número de macrófagos produtores de IL-10.. .....	58
Figura 12 - Correlações negativas dos níveis de glicose (semana 17) e populações celulares produtoras de citocinas no grupo tratado com AdEX.....	59
Figura 13 - Animais tratados com extrato bruto de <i>N. americanus</i> apresentaram menores quantidades de NO no soro.. .....	60
Figura 14 - Sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais tratados com extrato bruto de <i>N. americanus</i> apresentaram menores quantidades de NO. ....	61

Figura 15 - Tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> aumenta produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ .....	62
Figura 16 - Gravidade do infiltrado inflamatório encontrado nas ilhotas pancreáticas dos grupos Controle e AdEx ao final de 18 semanas de tratamento. ....	64
Figura 17 - Comparação das amplificações dos genes de ácido retinóico (Retnla), Arginase (Arg), TGF- $\beta$ e IL-10 após 18 semanas de tratamento em esplenócitos.....	65
Figura 18 - Resumo dos principais resultados obtidos nos animais tratados com extrato bruto de <i>N. americanus</i> . ....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de referência para diagnóstico de diabetes <i>mellitus</i> .....	19
Tabela 2 - Anticorpos utilizados na marcação de esplenócitos e citocinas. ....	44
Tabela 3 – Genes testados pela técnica de q-PCR.....	47
Tabela 4 – Número e classificação de ilhotas por grupo de animais.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS:

DM: Diabetes Melittus

DM1: Diabetes *Mellitus* Tipo 1

DM2: Diabetes *Mellitus* Tipo 2

## LISTA DE SIGLAS:

ADA: *American Diabetes Association* (Associação Americana de Diabetes)

APC: *Antigen-presenting cell* (Células Apresentadoras de Extrato bruto)

BB: ratos *BioBreeding*

BCA: *Bicinchoninic acid assay* (Ensaio bioquímico Colorimétrico)

CIAD: Autoanticorpos anti-Ilhota pancreática

DAB: 3,3'- diaminobencidina

END: Neurotoxina derivada de Eosinófilo

GAD: Descarboxilase do Ácido Glutâmico

HLA: *Human leukocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)

IaaS: Autoanticorpos contra Insulina

IDDM: *Insulin-Dependent Diabetes Mellitus* (Diabetes *Mellitus* Dependente de Insulina)

IDO: Indoleamina 2,3-dioxegenase

IFN: Interferon

IG: Imunoglobulina

IL: Interleucina

NEED: N-1-naphtylethylenodiamina

NK: *Natural Killer*

NOD: *Non-Obese Diabetic*

SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes

TGF: *Transforming growth factor* (Fator Transformante de Crescimento)

TNF: *Tumor necrosis factor* (Fator de Necrose Tumoral)

### **LISTA DE SÍMBOLOS:**

$\gamma$ : Gamma - Letra do alfabeto grego

$\beta$ : B - Letra do alfabeto grego

$\alpha$ : Alfa - Letra do alfabeto grego

$\mu\text{g}$ : Micrograma

$\mu\text{l}$ : Microlitro

mg: Miligrama

ml: Mililitro

dl: Decilitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Objetivo Geral .....	16
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1 Diabetes <i>Mellitus</i> .....	17
2.2 Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1 .....	20
2.2.1 Epidemiologia .....	21
2.2.1.1 Imunogenética .....	22
2.2.1.2 Fatores Ambientais .....	23
2.2.1.3 Patogenia e autoimunidade .....	24
2.2.2 Células $\beta$ pancreáticas .....	26
2.2.3 A inflamação da DM1 - Infiltrado Inflamatório e citocinas .....	27
2.3 Modelo Experimental .....	30
2.3.1 Diabetes Experimental Espontâneo: .....	30
2.3.1.1 Camundongo NOD .....	31
2.4 Hipótese da Higiene .....	32
2.5 <i>Necator americanus</i> : .....	34
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	36
3.1 Animais experimentais .....	36
3.2 Obtenção de extrato bruto a partir de helmintos <i>Necator americanus</i> .....	36
3.3 Tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> .....	37
3.4 Aferição de glicose .....	37
3.5 Produção de lâminas de esfregaço sanguíneo .....	38
3.5.1 Análise das lâminas de esfregaço sanguíneo .....	39
3.6 Procedimentos de eutanásia dos animais .....	40
3.6.1 Obtenção de soro a partir do sangue .....	40

3.6.1.1 Dosagem de citocinas no Soro (CBA).....	40
3.6.1.2 Dosagem de Óxido Nítrico em Soro .....	41
3.6.2 Recuperação de esplenócitos:.....	42
3.6.2.1 Marcação dos esplenócitos para citometria de fluxo:.....	42
3.6.2.1.1 Anticorpos utilizados:.....	43
3.6.2.1.2 Análise dos dados a partir do citômetro de fluxo .....	45
3.6.2.2 Dosagem de Óxido Nítrico em sobrenadante de cultura de esplenócitos.....	45
3.6.2.3 Análise da expressão de citocinas em esplenócitos por qRT-PCR.....	45
3.6.5 Histologia das amostras pancreáticas .....	45
3.6.5.1 Confeção de lâminas coradas com método de H.E.....	45
3.6.5.2 Imuno-histoquímica das amostras de pâncreas .....	45
3.7 Análise estatística dos dados .....	50
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 A glicemia dos animais não foi alterada pelo tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> : .....	51
4.2 Tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> altera níveis de leucócitos em sangue de camundongos NOD .....	52
4.2.1 Linfócitos.....	52
4.2.2 Eosinófilos.....	54
4.2.3 Leucometria Total Absoluta.....	55
4.3 Tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> aumenta número de linfócitos e macrófagos produtores de IL-4 e IL-10 .....	55
4.3.1 Linfócitos T CD4+ .....	56
4.3.2 Linfócitos T CD4+CD25+.....	56
4.3.3 Linfócitos T CD8+ .....	57
4.3.4 Macrófagos.....	58
4.4 Correlações negativas entre glicemia e citocinas produzidas pelos animais tratados com extrato bruto de <i>N. americanus</i> : .....	59

4.5 Tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> diminuiu produção de óxido nítrico.....	60
4.6 Tratamento com extrato bruto de <i>N. americanus</i> alterou a produção de citocinas.....	61
4.7 Animais tratados com AdEx apresentaram menos ilhotas com infiltrado inflamatório na análise Histologia das amostras de pâncreas .....	63
4.7.1 Lâminas Coradas por H.E.....	63
4.8 Tratamento com com extrato bruto de <i>N. americanus</i> alterou a expressão de citocinas .....	64
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	67
5.1 Considerações Finais .....	77
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
<b>ANEXO 1</b> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença crônica autoimune e, assim como as demais diabetes, possui como característica principal altos níveis de glicose no sangue. A DM1 é marcada pela destruição de células  $\beta$  pancreáticas, produtoras de insulina, por células T e anticorpos autorreativos. Com a progressão da doença, além da hiperglicemia, acumulam-se outros distúrbios metabólicos como de carboidratos, de proteínas e de lipídios que, a longo prazo, culminam em danos, disfunções e até mesmo falência de vários órgãos.

Alguns gatilhos ambientais combinados a falhas imunológicas podem levar ao início da patogênese da DM1; tem-se a ativação de células T autorreativas que acabam por reconhecer autoantígenos presentes nas células- $\beta$ , destruindo-as e impossibilitando a produção de insulina. O mecanismo de ativação de células T autorreativas é complexo e multifatorial, podendo ser explicado, dentre outras hipóteses, pela carência ou ausência de exposição a patógenos na primeira infância. Tal exposição parece ter um papel de amadurecer e equilibrar o sistema imunológico, suprimindo células T autorreativas através da interação com células apresentadoras de antígenos (APC) e células T reguladoras (Treg). Essa hipótese, denominada Hipótese da Higiene, foi proposta em 1989 por David Strachan.

A desregulação imunológica vista na DM1 também envolve a participação de várias citocinas inflamatórias, de perfil Th1, secretadas, principalmente por linfócitos CD4+ e CD8+ autorreativos. Essas células, quando ativadas, migram até o pâncreas e destroem as células  $\beta$ , tornando o organismo insulino-deficiente.

Por outro lado, infecções helmínticas são conhecidas por estimularem a proliferação de células T regulatórias, e a secreção de citocinas de perfil Th2, antagônicas às encontradas nas doenças autoimunes.

A proposta deste estudo é tentar reestabelecer o equilíbrio imunológico em camundongos com diabetes autoimunes (NOD), através da administração de extrato bruto de *Necator americanus*.

## 1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento de extrato bruto de *Necator americanus* em modelo murino com diabetes tipo 1.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar as diferenças entre os níveis de glicemia dos animais tratados com extrato bruto de *N. americanus* e animais controle.
- Comparar o perfil de leucócitos em sangue periférico em modelo murino NOD após tratamento com extrato bruto de *N. americanus*.
- Comparar a produção de citocinas e óxido nítrico, no plasma, dos animais tratado com extrato bruto de *N. americanus* e animais controle.
- Avaliar o perfil de células do sistema imunológico produtoras de citocinas no baço.
- Comparar a expressão de genes de citocinas inflamatórias e regulatórias entre animais tratados com extrato bruto de *N. americanus* e animais controle.
- Comparar a produção óxido nítrico de esplenócitos entre os animais tratado com extrato bruto de *N. americanus* e animais controle
- Determinar a gravidade do infiltrado inflamatório das ilhotas pancreáticas dos animais tratados com extrato bruto de *N. americanus* e animais controle.
- Avaliar, por meio de marcadores específicos, as populações celulares presentes no infiltrado inflamatório de ambos os grupos de animais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Diabetes *Mellitus*

A diabetes *mellitus* (DM) é um complexo de doenças metabólicas de caráter crônico, caracterizada pela presença de altos níveis de glicose no sangue. Essa condição ocorre quando o organismo não produz quantidades adequadas de hormônio insulina, quando as células em geral não respondem ao hormônio de forma eficiente, ou mesmo ambas as situações (Association, 2014; Tun *et al.*, 2017).

A insulina é um hormônio essencial ao funcionamento do organismo, e é produzida pelas células  $\beta$ . Ela medeia o transporte da glicose da corrente sanguínea para dentro da célula, permitindo que a glicose seja convertida em energia. Logo, problemas na produção de insulina ou na eficiência de resposta à mesma provocam aumentos de glicose circulante, quadro denominado hiperglicemia. Associada a essa condição, observa-se também distúrbios no metabolismo de proteínas e lipídios. Em longo prazo, o não controle da hiperglicemia pode causar complicações, que incluem danos, falhas ou disfunções, especialmente, nos nervos, rins, olhos, vasos sanguíneos e coração (Alam *et al.*, 2014).

As diabetes tipo 2 e tipo 1 são os tipos mais prevalentes da doença, somando 95% dos casos. DM1 é mais frequente em indivíduos jovens, como resultado da destruição de células  $\beta$  pancreáticas mediadas por células do sistema imunológico (Patterson *et al.*, 2009). Na DM2 os níveis de glicose não conseguem ser mantidos dentro dos limites normais, pois as células do indivíduo adquiriram resistência à insulina, logo por mais que se produza o hormônio a glicose não consegue entrar nas células e continua circulando no sangue (Triplitt *et al.*, 2015; Kahaly e Hansen, 2016).

Os sintomas associados à hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, visão turva e, às vezes, perda de peso acentuada. Frequentemente, pacientes com DM também desenvolvem insuficiência renal, doenças oculares que podem levar à cegueira, ulcerações nas

extremidades do corpo com risco de amputações, e neuropatias autonômicas, que se manifestam como problemas gastrointestinais, geniturinários, cardiovasculares e disfunção sexual (Canivell e Gomis, 2014). Pessoas com hiperglicemia também apresentam mais chances de desenvolver doenças ateroscleróticas e doenças vasculares cerebrais. As diabetes também tem sido apontada como fator de agravo, direto ou indiretamente, de problemas no sistema musculoesquelético, no sistema digestório, na função cognitiva e na saúde mental, além de ser associado a diversos tipos de câncer (SBD Diretrizes 2017-2018). Ademais, por vezes, as diabetes não controladas podem levar a óbito devido à acetoacidose ou à síndrome hiperosmolar não cetótica (Association, 2014; Kerner *et al.*, 2014; Triplitt *et al.*, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a DM como uma epidemia global crescente, com aproximadamente 425 milhões de casos (WHO, 2017; IDF, 2017). A Organização estima que a glicemia elevada seja a terceira maior causa de mortes prematuras, em importância, atrás apenas de pressão alta e uso de tabaco (SBD DIRETRIZES 2017-2018). Soma-se a este cenário, o fato que segundo estimativas do IDF, um em cada dois adultos com a doença ainda não foi diagnosticado e o próprio sistema de saúde e a população em geral são pouco conscientizados sobre a gravidade da DM. As mudanças nas tendências globais de complicações da DM, bem como as mudanças em suas características de morbidade associada, não têm recebido a devida atenção. Como resultado tem-se que a DM pode permanecer não detectada por vários anos, desenvolvendo suas complicações e comorbidades (SBD DIRETRIZES 2017-2018).

A DM é também considerada uma doença de alta incapacitação, devido ao seu caráter crônico e às graves complicações, que afetam não só o paciente, mas também sua família e o próprio sistema de saúde, que tem gastos entre 2 a 3 vezes maiores do que com indivíduos sem a doença (De Groot *et al.*, 2010; Gemeay *et al.*, 2015). Dados do IDF, apontam que a diabetes demanda cerca de 12% dos gastos globais com saúde (727 bilhões de dólares) (IDF, 2017). Outrossim, há o impacto sobre a qualidade de vida dessas pessoas, afetando sua produtividade devido a dores e problemas psicológicos (De Groot *et al.*, 2010; Gemeay *et al.*, 2015).

No entanto, o desenvolvimento de complicações de saúde incapacitantes e com iminentes riscos à vida pode ser evitado ou retardado, se houver o tratamento adequado do

diabetes. Para tanto um diagnóstico precoce e diferencial, entre os tipos de DM, é decisivo (Kahaly e Hansen, 2016). Segundo a Federação Internacional de Diabetes, a classificação e o diagnóstico do DM é complexo. Mas tem-se aceito três tipos principais de diabetes: DM tipo 1, DM tipo 2 e DM gestacional. Outros tipos menos comuns são o diabetes monogênico e o diabetes secundário (SBD DIRETRIZES 2017-2018).

Os parâmetros para diagnóstico de DM têm sido debatidos e atualizados ao longo do tempo, mas segundo critérios da OMS, a DM é diagnosticada observando-se níveis elevados de glicose no sangue, conforme tabela abaixo (Tabela 1). Nesse contexto, existem ainda duas categorias de pré-diabetes consideradas fatores de risco para desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares. São elas: glicemia de jejum alterada, caracterizada por apresentar alterações na glicemia acima do normal, mas abaixo do critério de diagnóstico ( $> 100$  mg/dl e  $< 126$  mg/dl); e tolerância à glicose diminuída, definida por níveis anormais de glicose em jejum, e em duas horas após ingestão oral de 75 gramas de glicose (140 e 199 mg/dl) (Association, 2014; Kerner *et al.*, 2014).

Tabela 1: Valores de referência para diagnóstico de DM. Glicose plasmática (mg/dl) (Adaptado de SBD Diretrizes):

<b>Categoria</b>	<b>Jejum<sup>*</sup> mg/dl</b>	<b>2h após 75g de Glicose</b>	<b>Casual<sup>**</sup></b>
Glicemia normal	$<100$	$<140$	
Tolerância à glicose diminuída	$>100$ a $<126$	$\geq 140$ a $<200$	
Diabetes <i>mellitus</i>	$\geq 126$	$\geq 200$	$\geq 200$ (com sintomas clássicos) <sup>***</sup>

\* Sem ingestão calórica por no mínimo 8h;

\*\* Mensurada a qualquer hora do dia sem observar o intervalo desde a última refeição;

\*\*\* Sintomas clássicos: poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso.

Há uma intervenção terapêutica distinta para cada tipo da doença, podendo consistir em dieta e exercícios, para indivíduos que não necessitam de insulina (DM2), reposição de insulina por vias exógenas ou até mesmo uso de imunossupressores (DM1). Assim, identificar a etiologia da doença é de suma importância para um tratamento eficiente e adequado (Balda e Pacheco-Silva, 1999; Kahaly e Hansen, 2016).

## 2.2 Diabetes Mellitus Tipo 1

A DM1 surge como resultado da destruição seletiva de células  $\beta$  pancreáticas, produtoras de insulina, pelo sistema imunológico, configurando uma autoimunidade. A patogênese da DM1 é multifatorial, e combina uma susceptibilidade genética, que possibilitaria a predisposição a respostas imunes anormais, a fatores ambientais específicos, como dieta e infecções, principalmente na primeira infância (Dejaco *et al.*, 2006; Heinonen *et al.*, 2015; Kahaly e Hansen, 2016; Katsarou *et al.*, 2017). Na DM1, as células T imunorreguladoras modulam o desenvolvimento e o agravamento da doença. Os fatores ambientais, em pessoas geneticamente susceptíveis, promovem autoimunidade e, com isso, o aparecimento de anticorpos anti-ilhota, evoluindo para uma desregulação metabólica, com perda de resposta à insulina, aumento de hemoglobina glicosilada, tolerância à glicose diminuída e diminuição do peptídeo C (Kahaly e Hansen, 2016; Katsarou *et al.*, 2017).

A doença pode desenvolver-se de forma latente, persistindo por anos sem sintomas. Suas manifestações clínicas, de fato, só aparecem quando uma parte considerável de células  $\beta$  já foi destruída (Kahaly e Hansen, 2016). Em lugares onde há carência de recursos médicos, os indivíduos com DM1 tendem a morrer precocemente por complicações metabólicas agudas (frequentemente por falta de insulina) ou infecções (sobretudo tuberculose).

A DM1, em humanos, pode ser subdividida em tipo 1A (imune mediada), tipo 1B (idiopática) e diabetes auto-imune latente em adultos (LADA). Geralmente, a DM1 inicia-se na infância ou na adolescência dos indivíduos no entanto, pode acometer indivíduos de qualquer idade (Patterson *et al.*, 2009; Leslie *et al.*, 2015; Triplitt *et al.*, 2015).

### 2.2.1 Epidemiologia

A DM1 representa entre 10% a 15% dos casos de diabetes mundiais, com perspectiva de aumento na taxa de incidência global e tendência de duplicação do número de casos na próxima década (Atkinson *et al.*, 2014; Katsarou *et al.*, 2017). A predisposição genética era, no passado, o fator explicativo para o aumento de casos. No entanto, tem-se observado um aumento considerável em todo mundo, que não pode ser explicado apenas por variações no *pool* gênico das populações, uma vez que ocorre com taxas de crescimento entre 3-5% ao ano (Daneman, 2006; Triplitt, 2012; Atkinson *et al.*, 2014; Canivell e Gomis, 2014).

Apesar de grandes variações geográficas, a DM1 é uma das doenças crônicas mais comuns em crianças entre 5 e 7 anos, ou no início da puberdade. E ao contrário da maioria dos distúrbios autoimunes, acomete proporcionalmente meninos e meninas. Apenas em modelo experimental diabético espontâneo observam-se diferenças nas taxas da doença em fêmeas e machos. (Wicker *et al.*, 2005; Atkinson *et al.*, 2014).

O caráter heterogêneo de distribuição da DM1 revela fatores genéticos combinados a diferentes fatores ambientais ligados à doença. Uma forte evidência disso é que a incidência de DM1 em jovens, especialmente crianças menores de 4 anos, vem aumentando consideravelmente com as mudanças nos estilos de vida, sugerindo fatores ambientais bem atuantes (Silva *et al.*, 2008; Association, 2012; Canivell e Gomis, 2014).

Hipóteses que ilustram a influência ambiental no DM1, como a Hipótese da Higiene têm despertado a atenção. Uma gama desses fatores parece ser capaz de influenciar na epidemiologia da DM1, como a dieta na primeira infância, níveis de vitamina D (e constituintes de sua via) e infecções virais, todavia ainda não se tenha identificado a influência inequívoca na patogênese (Atkinson *et al.*, 2014).

### 2.2.1.1 Imunogenética

A DM1 é um distúrbio poligênico, onde (até então) são descritos 40 *loci* do complexo principal de histocompatibilidade (HLA) relacionados à disfunção (Atkinson, 2014). Entre os genes associados à DM1, os mais importantes estão localizados nos cromossomos 6, 11, 1 e 2, sendo que o complexo do gene HLA no cromossomo 6p21 é o fator genético com a associação mais forte de susceptibilidade, fornecendo quase metade de predisposição à doença (Atkinson *et al.*, 2014; Morran *et al.*, 2015).

Os linfócitos T CD8+, presentes no infiltrado celular, interagem com as ilhotas via moléculas de HLA de classe I. Essa interação é de grande importância, visto que as células  $\beta$  hiperexpressam tais moléculas. (Morran *et al.*, 2015; Noble, 2015).

Por outro lado, os *loci* DR e DQ, parte do repertório de moléculas HLA de classe II, são responsáveis por 40 a 50% da susceptibilidade a DM1A, expressando moléculas de predisposição ou proteção, dependendo do haplótipo, sendo assim, capazes de estimular ou inibir a autoimunidade (Silva *et al.*, 2008).

Além dos alelos de HLA que conferem susceptibilidade, há polimorfismos de genes não-HLA que contribuem para o risco de DM1. Foram descritos, até o momento, 50 *loci* não-HLA que são considerados fatores de alto risco para susceptibilidade a DM1. Nesse grupo de genes estão incluídos os genes da insulina, da variante funcional específica da proteína-tirosina-fosfatase linfóide no cromossomo 1p13 (PTPN22), variante da proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (CTLA-4), da subunidade alfa do receptor de IL-2 (IL2RA), e um gene do tipo lectina (KIA00350) (Pociot *et al.*, 2010; Morran *et al.*, 2015).

A susceptibilidade a DM1, tanto em humanos como em murinos, parece combinar negativamente, uma série de alelos permissivos para desordens autoimunes, encontrados também em não-diabéticos, com fatores ambientais específicos (Buschard, 2011). Cerca de 30% da população apresenta alguma predisposição genética, mas apenas 0,5% dos afetados progridem de fato para DM1 (Eisenbarth, 2004; Atkinson *et al.*, 2014).

### 2.2.1.2 Fatores Ambientais

Os fatores ambientais são tidos como desencadeadores da DM1 em indivíduos susceptíveis, sendo capazes de modificar a patogênese da doença (Atkinson e Eisenbarth, 2001). A atuação dos fatores ambientais é tão importante quanto a predisposição genética, uma vez que 85% dos pacientes com DM1 não possuem precedentes da doença na família (Morran *et al.*, 2015; Ferretti e La Cava, 2016; Pearson *et al.*, 2016). Uma das explicações mais aceitas para essa observação é a Hipótese da Higiene que correlaciona o súbito aumento de doenças autoimunes, como DM1, com melhoras na qualidade do saneamento básico (Bach, 2002; Morran *et al.*, 2015).

A DM1 pode ser considerada uma doença da atualidade, e teve sua incidência aumentada a partir da década de 1940 do século XX, com as mudanças nos padrões de saneamento básico, dieta e exposição a agentes infecciosos (Todd, 2010; Morran *et al.*, 2015).

O papel efetivo dos fatores ambientais, bem como quais são eles, ainda está pouco esclarecido na DM1. Especula-se que algumas infecções microbianas, em indivíduos geneticamente susceptíveis, podem iniciar ou exacerbar a inflamação nas ilhotas pancreáticas, contribuindo, com isso, com o início de uma autoimunidade (Clark *et al.*, 2017). Um exemplo é a relação de DM1 com infecções pelo enterovírus Coxsackiev B1, onde as partículas virais poderiam promover um citólise das células  $\beta$  e provocar uma inflamação local, que mais tarde conduziria à autoimunidade (Clark *et al.*, 2017). Outro exemplo são as infecções não citolíticas, que induziriam uma maior expressão de IFN- $\gamma$  pelas células  $\beta$ , o que também resultaria na hiperexpressão de moléculas HLA de classe I (Clark *et al.*, 2017).

A composição da microbiota intestinal também parece ter algum efeito modulador na DM1. Estudos conduzidos por Wen e colaboradores mostraram que mudanças na microbiota de camundongos NOD, podem promover ou prevenir a destruição de células  $\beta$ . O mesmo parece ser válido para a DM1 humana (Wen *et al.*, 2008; Kostic *et al.*, 2015).

Além desses, tem-se alimentação de neonatos com fórmulas altamente hidrolisadas, exposição precoce ao glúten, deficiência de vitamina D, exposição a determinados

complexos virais e até componentes psicossociais como fatores desencadeantes para DM1 (Daneman, 2006; Morran *et al.*, 2015).

### 2.2.1.3 Patogenia e autoimunidade

A autoimunidade da DM1 é primordialmente mediada por linfócitos T, B e *natural killers* (NK), e células apresentadoras de antígenos (APC's) como macrófagos e algumas células dendríticas. A patogenia da DM1 tem início ainda na ontogenia, mais especificamente na geração de repertórios de receptores de células T (TCR), no timo. Uma seleção negativa ineficiente permite que timócitos reativos para auto-antígenos simples sobrevivam (Atkinson *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 2017). Consequentemente, gera-se um reservatório periférico de células T autorreativas anti-células  $\beta$  que tem sua sobrevivência aumentada conforme reconhecem como antígenos os complexos HLA com alta avidéz e afinidade (Kahaly e Hansen, 2016; Clark *et al.*, 2017).

É sabido que as células  $\beta$  não expressam HLA de classe II, logo especula-se que os auto antígenos sejam liberados no pâncreas e encaminhados para os linfonodos, onde são processados por células dendríticas. Em sequencias, células T positivas para células  $\beta$  são ativadas, sofrem expansão clonal, e são recrutadas nas ilhotas pancreáticas (Shao *et al.*, 2012), causando eventos imunológicos que seguirão à morte das células  $\beta$ .

Outra hipótese é que a insulite ocorre conforme os linfócitos T reconhecem peptídeos, expressos no HLA de classe I das células  $\beta$ , e ocorre um desequilíbrio no mecanismo de tolerância aos antígenos próprios. Os denominados “pontos de ajuste autorreativos balanceados” são um delicado equilíbrio entre células T pró-inflamatórias e regulatórias, que na DM1 são infligidos caracterizando a perda de tolerância a antígenos próprios, e dando início à doença (Balda e Pacheco-Silva, 1999; Ferretti e La Cava, 2016).

A partir daí, linfócitos T, linfócitos B, células NKs e APCs agem sinergicamente em um processo de destruição das células- $\beta$  pancreáticas que resultará no quadro clínico da DM1 (Silva *et al.*, 2008; Zóka *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2014; Ferretti e La Cava, 2016).

A autoimunidade no pâncreas é um processo que normalmente progride em vários anos, e quando ativada passa por um longo período pré-diabético assintomático (ou fase subclínica), em que há perda progressiva da secreção de insulina. (Ferretti e La Cava, 2016).

Tem-se evidências de que o processo inflamatório compõe-se por: 1) infiltração das ilhotas por linfócitos e macrófagos - insulite; 2) produção de anticorpos anti antígenos de células de ilhota, anti tirosina-fosfatase, anti glutamato descarboxilase 65-kDa, anti insulina e anti transportador de zinco ZnT8 (Slc30A8) (Kahaly e Hansen, 2016).

Estudos paralelos, de fato, confirmaram que o epítipo dominante da insulina (Ins B9-23) desempenha um papel primacial no desenvolvimento da autoimunidade tanto em camundongos NOD quanto em humanos (Nakayama *et al.*, 2005; Brezar *et al.*, 2011). Os outros antígenos são menos específicos de ilhota, mas ainda assim são marcadores muito confiáveis da autoimunidade da DM1 (Geenen, 2012). Apesar de 90% dos pacientes com DM1 apresentarem autoanticorpos diversos, a significância patogênica destes anticorpos é baixíssima, se não ausente. Visto que os elementos efetivos da destruição autoimune, no caso de células  $\beta$ , são os linfócitos T CD4+ e CD8+ autorreativos (Geenen, 2012).

Como característica marcante da DM1, e consequência da ação do sistema imunológico, tem-se o estado hiperglicêmico permanente. Suas manifestações clínicas surgem quando, pelo menos, 80% das células- $\beta$  são eliminadas e as células remanescentes são incapazes de se regenerar, tornando a produção de insulina insuficiente (Fernandes *et al.*, 2005; Coppieters e Von Herrath, 2009). Alcançado este ponto, há a necessidade consistente de reposição insulínica por vias exógenas (Balda e Pacheco-Silva, 1999; Van Belle *et al.*, 2011; Atkinson *et al.*, 2014). A produção de glucagon é aumentada, uma vez que o efeito supressor da insulina é perdido. Observa-se também diminuição da produção de enzimas pancreáticas (Balda e Pacheco-Silva, 1999; Silva, Mory e Davini, 2008).

O grau de hiperglicemia é reflexo direto do grau de comprometimento das células  $\beta$  e dessas anormalidades metabólicas. A severidade das alterações metabólicas pode progredir ou estabilizar, fazendo-se necessário acompanhamento do paciente para possíveis ajustes no tratamento (Association, 2014).

### 2.2.2 Células $\beta$ pancreáticas

As ilhotas de Langerhans compõem o pâncreas endócrino e são compostas por diversos tipos celulares responsáveis pela produção de hormônios no órgão. Entre estes estão as células  $\beta$  pancreáticas, produtoras do hormônio insulina (Jennings *et al.*, 2015).

Naturalmente, as células- $\beta$  se predispõem a uma susceptibilidade de esgotamento devido a pouca reserva celular e baixa capacidade de proliferação (Coppieters e Von Herrath, 2009). O pâncreas, e demais órgãos produtores de hormônios, possuem alta expressão e secreção de moléculas específicas, por isso podem ser alvos mais frequentes de ataques do sistema imunológico. Evidências sugerem que quanto maior a atividade secretora do pâncreas, seja por ingestão exacerbada de alimentos com alto índice glicêmico ou por menor número de ilhotas pancreáticas, maiores as chances de se desenvolver uma doença autoimune órgão específica (Buschard, 2011).

Estudos mostram que células  $\beta$  metabolicamente hiperativas são mais sujeitas a ataques pelo sistema imunológico por expressarem mais autoantígenos, mais moléculas de aderência e mais moléculas de HLA de classe I (Coppieters e Von Herrath, 2009; Coppieters *et al.*, 2013). As células  $\beta$  com alta atividade também secretam mais pró-insulina o que leva ao aparecimento de neo-epítomos, como peptídeo de cadeia B da insulina e peptídeo C da insulina, os quais podem funcionar como epítomos crípticos indutores de autoimunidade (Rosmalen *et al.*, 2002).

Associada à essas condições, tem-se que as células  $\beta$  apresentam atividade funcional limitada por homeostase de cálcio, estresse oxidativo e demanda periférica de insulina, influenciando diretamente na produção e processamento de proteínas pelo retículo endoplasmático. Assim, perturbações nesses fatores podem descompensar a produção de insulina, gerando moléculas de proinsulina e peptídeo C, potencialmente propícias para induzir autoimunidade (Rosmalen *et al.*, 2002; Maganti, Evans-Molina e Mirmira, 2014).

Além disso, a ilhota tem características intrínsecas que atuam na indução da inflamação, como a expressão de CXCL10, que, em altas concentrações, parece acelerar a progressão da doença por estimular a migração de células T efetoras para a ilhota pancreática. As células  $\beta$  também secretam CXCL1 e CXCL2 que são quimiotáticos para neutrófilos com CXCR2 para ilhota. A presença de tais neutrófilos contribui para estimular a reatividade de

células T específicas de células  $\beta$  (Askenasy, 2015; Clark *et al.*, 2017). Ademais, há também a secreção de IL1- $\beta$  por células  $\beta$  e  $\alpha$ , que em baixos níveis é benéfica, por estimular a regeneração das células  $\beta$  e a produção de insulina. No entanto, pode iniciar uma inflamação mediada por leucócitos (aumenta a expressão de CCL2, CXCL1, CXCL2), e no contexto de TNF $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  induz à apoptose das células  $\beta$  (Clark *et al.*, 2017).

Em longo prazo, com a destruição da maioria das células  $\beta$  há uma sobrecarga para as células remanescentes, esgotando sua capacidade de produção de insulina e estimulando a liberação de neo-antígenos (Ferretti e La Cava, 2016).

Com o avanço da técnica de imuno-histoquímica, foi demonstrado que em, pelo menos, 70% das ilhotas de pâncreas de crianças com DM1, não havia mais células  $\beta$ . Os demais tipos celulares foram mantidos (Richardson *et al.*, 2014).

Histologicamente, as células- $\beta$ , secretoras de insulina, são mais numerosas nas ilhotas do que as células secretoras de glucagon, de somostatina e de polipeptídeos pancreáticos. Logo, com a evolução da doença, apesar dos outros tipos serem poupados, o pâncreas exócrino perde volume e se atrofia (Balda e Pacheco-Silva, 1999).

### **2.2.3 A inflamação da DM1 - Infiltrado Inflamatório e citocinas**

A inflamação vista na DM1 é interposta por vários tipos de células citotóxicas e mecanismos moleculares redundantes, que convergem e cooperam no ataque das células  $\beta$  (Askenasy, 2015). As citocinas e quimiocinas são elementos fundamentais na comunicação entre células imunológicas, e dentre suas funções são capazes de promover o direcionamento de leucócitos para os sítios inflamatórios e compor a resposta frente a um estímulo. Ainda não estão bem descritas todas as citocinas e quimiocinas que constituem a patogênese da DM1, nem estão bem elucidados os mecanismos de ação das mesmas (Roep, 2003).

Tem sido demonstrado por estudos com modelos murinos NOD que o perfil de citocinas na DM1 é de padrão Th1, estando presentes majoritariamente as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Estudos de Suk e colaboradores (2001)

demonstraram que o sinergismo entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  as definem com as moléculas efetoras finais da DM1 (Suk *et al.*, 2001).

As células linfocitárias predominantes no infiltrado inflamatório nas ilhotas são os linfócitos T CD8+ citotóxicos, seguidos pelos linfócitos T CD4+ e linfócitos B (Balda e Pacheco-Silva, 1999; Fernandes *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2014). Os eventos que culminam na destruição das células produtoras de insulina têm início com a apresentação de auto antígenos específicos, por macrófagos ou células dendríticas aos linfócitos T CD4+, via HLA classe II (Rassi *et al.*, 2008). A proliferação e diferenciação dos linfócitos T, linfócitos B e macrófagos no infiltrado ocorrem mediante citocinas secretadas por linfócitos T CD4+.

Apesar de macrófagos não serem abundantes no infiltrado inflamatório, uma vez ativados eles são agentes importantes da inflamação das ilhotas por secretar citocinas pró-inflamatórias e moléculas solúveis quimiotáticas para células dendríticas, e ativadoras de T CD4+ e T CD8+. Eles também secretam óxido nítrico, um dos principais agentes de lesão e morte de células- $\beta$  (Fernandes *et al.*, 2005; Kachapati *et al.*, 2012). Na DM1 há um processo cíclico, na qual há a geração de espécies reativas de oxigênio que estimulam a produção de citocinas inflamatórias e vice-versa, o que conduz a um ambiente altamente inflamado (Sharma *et al.*, 2018).

Os linfócitos B na DM1 tem grande importância na apresentação de antígenos e coestimulação doutras células e, posteriormente, na secreção de anticorpos (Fernandes *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 2016) . Em adolescentes e adultos, os anticorpos anti-GAD são os mais encontrados, enquanto que em crianças os primeiros a serem detectados são os anticorpos anti-insulina (Buschard, 2011). A presença de um ou mais tipos de anticorpos confirma o diagnóstico e, em altos títulos, é determinante para o desenvolvimento de DM1.

Os linfócitos T CD8 reconhecem antígenos pancreáticos expressos via HLA de classe I e destroem as células marcadas por indução de apoptose e liberação de perforina e granzima. Uma vez ativados, os linfócitos podem recrutar células NK que desgranularão nas células  $\beta$ , matando-as (Fernandes *et al.*, 2005; Buschard, 2011; Pearson *et al.*, 2016; Clark *et al.*, 2017).

A liberação das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , por linfócitos, macrófagos e até mesmo pelas próprias células  $\beta$ , causa lesões funcionais na síntese e secreção de insulina e

apoptose das células  $\beta$ . A apoptose de células  $\beta$  também é estimulada por ativação de vias de sinalização, como fator nuclear  $\kappa\beta$  e p38 mitogênio-proteína ativada (Mullen, 2017).

IFN- $\gamma$  secretado promove mais estímulos quimiotáticos que induzem mais células T, B e inatas a migrar e permanecer nas ilhotas. Ele também estimula a produção de espécies reativas de oxigênio por células estromais e APCs residentes nas ilhotas, que prejudicam a função e medeiam a necrose das células  $\beta$  (Clark *et al.*, 2017).

Há estudos que demonstraram um aumento também de células de perfil Th17 no infiltrado inflamatório que permeiam as ilhotas, no entanto, sua atuação ainda não está esclarecida (Clark *et al.*, 2017)

Outro fator que contribui para a instalação de DM1 é a descompensação de células Treg em indivíduos com a autoimunidade. As células Treg operam no local da inflamação por diversos mecanismos que incluem: modulação do microambiente por secreção de citocinas anti-inflamatórias, inibição da proliferação de células T efetoras patogênicas e diminuição da ação de APCs, inibição da produção de citocinas inflamatórias e indução direta de morte de células citotóxicas (Askenasy e Askenasy, 2013).

A falta de expressão de Foxp3 em humanos e murinos leva à autoimunidade, devido à falta de supressão de células T autorreativas e outros efetores imunológicos, além da falta de secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 (Clark *et al.*, 2017).

Tanto humanos com DM1 quanto o camundongo NOD apresentam deficiência na produção de IL-2 (por células T e dendríticas), uma importante citocina para a homeostase, expansão e função de células T Reg Foxp3+ (Askenasy, 2016; Clark *et al.*, 2017). Estudos com camundongos NOD demonstraram uma rápida e constante expansão de células T, sugerindo uma sensibilidade reduzida à modulação por IL-10 e TGF- $\beta$  (Askenasy, 2016).

Considerando a característica antagonista das citocinas pertencentes a diferentes perfis, há estudos com DM1 e outras doenças inflamatórias que tentam alterar a resposta imunológica para o perfil anti-inflamatório (Th2), antagônico ao Th1 e, assim, bloquear o desenvolvimento da doença (Balda e Pacheco-Silva, 1999; De Oliveira *et al.*, 2011).

## 2.3 Modelo Experimental

Segundo Wessler (1976), um modelo animal pode ser definido como “um organismo vivo com um processo patológico herdado, adquirido naturalmente, ou induzido, e em um ou mais aspectos, assemelha-se estreitamente ao mesmo fenômeno que ocorre no homem” (Wessler, 1976).

Há várias dificuldades nos estudos histológicos de pâncreas humanos devido à inacessibilidade ao órgão alvo (Coppieters e Von Herrath, 2009; Ferretti e La Cava, 2016). Uma alternativa é adotar modelos experimentais que se assemelhem às condições patológicas da doença humana. Os animais que desenvolvem espontaneamente diabetes são uma ferramenta de estudos que contribuem para o entendimento dos mecanismos patológicos da DM1 (Kirsten *et al.*, 2010). Nesse contexto, existem dois grupos de modelos animais muito utilizados em pesquisas, classificados em: diabetes *mellitus* induzido quimicamente e diabetes *mellitus* espontâneo (Homo-Delarche, 2001).

### 2.3.1 Diabetes Experimental Espontâneo

A DM1 possui dois modelos murinos mais utilizados, os ratos *BioBreeding* (BB) e os camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*), que desenvolvem diabetes auto-imune espontaneamente e são compatíveis com a patologia em humanos, mas que possuem entre eles mecanismos de patogênese distintos e complementares (Kirsten *et al.*, 2010; Boitard, 2012).

Os ratos *BioBreeding* foram descobertos no Laboratório BioBreeding, no Canadá. Os animais da linhagem apresentam linfopenia, e incidência cumulativa de DM1 de 100%, quando mantidos em ambiente livre de patógenos. Vários estudos com ratos BB têm demonstrado a importância das células T na DM1 através imunopatogênese no modelo. O outro modelo experimental são os camundongos NOD, descobertos em 1974, no Japão, sendo esses os mais amplamente utilizados nas pesquisas com DM1 (Kirsten *et al.*, 2010; Boitard, 2012). Detalhes sobre o modelo NOD serão abordados no próximo tópico.

### 2.3.1.1 Camundongo NOD

O camundongo NOD é o modelo mais utilizado para estudo de DM1 devido à sua patologia ser mediada por células T, assim como em humanos. Esses camundongos são resultado de gerações de cruzamentos endogâmicos de animais da linhagem Jc1–ICR, livres de catarata (cepa Cataract Shionogi - CTS) e com altos níveis de glicose em jejum. Assim como na doença humana, apresentam poliúria, glicosúria, perda de peso e infiltração linfocítica das ilhotas de Langerhans (Pearson *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018).

Os camundongos NOD começam a desenvolver diabetes autoimune a partir de 12 semanas de idade, sendo mais prevalente em fêmeas. Todavia, as alterações histológicas costumam aparecer por volta de 3 semanas de idade, e consistem em aumento das células endoteliais nos vasos das ilhotas e infiltração de células dendríticas, macrófagos e neutrófilos culminando em insulite. Secundariamente, essas células atraem subgrupos adaptativos ao infiltrado peri-insular principalmente T CD4+ e T CD8+ (Boitard, 2012; Pearson *et al.*, 2016).

Com fenótipo albino, o caráter homozigótico para o halótipo H-2 desses camundongos parece contribuir para o aparecimento de um vasto e diverso repertório de células T autorreativas, que se desenvolvem devido a uma seleção tímica deficiente. Estudos com camundongos NOD mostraram um menor número de linfócitos T, principalmente CD4+, quando comparados a outras estirpes auto-ímmunes, como BALB/c selvagem. Logo, essa linfopenia conduziria a uma expansão celular natural, denominada proliferação homeostática. Contudo, esse processo interfere na natureza das populações de células T, estimulando a expansão de células autorreativas, iniciando assim, a autoimunidade (King *et al.*, 2004; Dejaco *et al.*, 2006; Askenasy, 2016). Existe um acúmulo de células T autorreativas no pâncreas, órgãos linfoides e glândulas submandibulares, prejudicando a produção de IL-2 e culminando em uma resistência dessas células à apoptose (Kirsten *et al.*, 2010).

Além disso, o modelo NOD apresenta também defeitos na secreção de citocinas pelas células T CD4+, com baixa produção de IL-4 e com produção de IFN- $\gamma$  exacerbada (Delovitch e Singh, 1997; Aoki *et al.*, 2005). Em paralelo, há também a presença de outras citocinas pró-inflamatórias em abundância, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Kirsten *et al.*, 2010).

A penetrância de DM1 nos camundongos NOD é altamente influenciada por fatores ambientais, especialmente por exposição a micróbios e dieta, visto que a estimulação por agentes infecciosos promove o amadurecimento do sistema imunológico e, conseqüentemente, diminui a suscetibilidade a DM1. Estudos revelaram uma diminuição significativa na incidência de DM1 em camundongos NOD tratados com uma dieta isenta de glúten, caindo de 64% para 15% de prevalência (Funda *et al.*, 1999). Além disso, a deficiência em vitamina D parece ter um papel importante no desenvolvimento da doença, visto que camundongos tratados com a molécula apresentam menores taxas de DM1. Com isso, para um manejo mais adequado desses animais faz-se necessário alocação em biotérios livres de patógenos, em gaiolas com microisoladores, autoclavadas e irradiadas, abertas em fluxo laminar. Além de tratamento rigoroso com anti-helmintícos e outros patógenos (Kirsten *et al.*, 2010).

Camundongos NOD mantidos nesses padrões exibem maior incidência de DM1 em fêmeas, cujas taxas variam entre 60-90%, enquanto em machos apresentam taxas de aproximadamente 10-30%. A variação entre os gêneros se dá pelo fato das fêmeas desta linhagem desenvolverem uma insulite mais severa. Tal fato reforça o papel dos hormônios sexuais no desenvolvimento de DM1 em camundongos NOD, visto que em machos castrados a taxa de incidência aumenta, e em fêmeas tratadas com andrógenos estas taxas diminuem (Delovitch e Singh, 1997).

## **2.4 Hipótese da Higiene**

A Hipótese da Higiene é uma das hipóteses mais importantes e mais bem aceitas no que diz respeito ao aumento de doenças de distúrbios imunológicos. Proposta por David Strachan, em 1989, correlaciona mudanças nos padrões de vida ocidentais com o aumento de doenças autoimunes, como DM1. O termo “Hipótese da Higiene não faz menção a comportamentos higiênicos individuais, mas refere-se à ampla carga de microorganismos ambientais com os quais tem-se contato (Bach, 2018). Strachan sugere que o contato com agentes patológicos, comuns na primeira infância, teria um papel de maturação do sistema imunológico, conferindo um *status* protetor contra autoagressões (Egro, 2013). Uma

explicação para essa hipótese consiste no importante papel das infecções em selecionar indivíduos sobreviventes, e moldar o sistema imunológico de modo a não desenvolver respostas desproporcionais, lesivas para o próprio tecido (Cooke, 2009b).

As mudanças drásticas no ambiente, que vem acontecendo desde o século 20, têm alterado a qualidade da higiene, da saúde e das condições médicas. Inversamente a esse cenário, temos aumentos consideráveis em doenças alérgicas e doenças autoimunes, apontados por estudos epidemiológicos (Bach, 1997; Cooke, 2009b; Bach e Chatenoud, 2012; Briggs *et al.*, 2016). Em paralelo, vários estudos com modelos experimentais têm demonstrado que infecções por diferentes patógenos podem prevenir doenças autoimunes. Apesar dos dados epidemiológicos sustentarem uma correlação robusta, os mecanismos subjacentes ainda são pouco elucidados (Bach, 2018).

A variação na frequência de DM1 está associada a vários motivos, e notavelmente há uma forte ligação de fatores genéticos a fatores ambientais. Na Europa genes de susceptibilidade HLA são mais frequentes do que no Japão, por exemplo (Todd, 1990; Wang *et al.*, 2017). No entanto, estudos com imigrantes que saíram de países com baixa incidência de DM1 para países com alta incidência mostraram um aumento significativo na frequência da doença na primeira geração de filhos dessas famílias sugerindo a participação de outros fatores que não os genéticos (Bach e Chatenoud, 2012).

Em modelos experimentais NOD pode-se observar que o tipo de ambiente onde os animais são mantidos interfere na incidência de DM1: animais mantidos em isolamento, nos ambientes livres de patógenos apresentam taxas de 60-90% de doentes, enquanto os expostos a agentes microbianos não desenvolvem DM1 (Fernandes *et al.*, 2005; Egro, 2013; Bach, 2018).

Camundongos NOD infectados por helmintos ou micobactérias, ou expostos a produtos desses organismos, tiveram o curso espontâneo da DM1 inibido, propondo rotas imunorreguladoras capazes de minimizar a resposta do hospedeiro a tecidos próprios e reduzir lesões locais (Cooke, 2009b; Bach, 2018).

Epítomos de agentes infecciosos podem interagir com células apresentadoras de antígenos, que exercem interação com células Treg e células T autorreativas, suprimindo sua ação. Por sua vez, as células Treg respondem produzindo IL-10 e TGF- $\beta$ , alterando o microambiente de inflamação da DM1 (Egro, 2013). Os antígenos dos promotores de

infecções competem por APCs, para ligação com peptídeos antigênicos. Há hipóteses que esses antígenos causem respostas imunológicas mais fortes que concorrem com sinais de respostas mais fracas, como de auto-antígenos (Egro, 2013).

## 2.5 *Necator americanus*

*Necator americanus* é um ancilostomídeo nematoide, que parasita seres humanos. As infecções por ancilostomídeos afetam, aproximadamente, 740 milhões de pessoas em todo mundo, concentrando-se principalmente em países tropicais. *Necator americanus* é encontrado principalmente nas Américas, África tropical e ilhas no Pacífico, sendo um dos nematóides mais prevalentes no Brasil (Hotez *et al.*, 2004; Gaze *et al.*, 2012; WHO, 2016).

Breve descrição do ciclo de vida de *N. americanus*:

- Ocorre a penetração cutânea de larvas em estado infectivo (L3), que atingem o sistema circulatório e são carregados para os pulmões, sobem o trato respiratório e são deglutidas.
- Ancilostomídeos jovens, então, colonizam o intestino delgado, tornam-se fêmeas e machos adultos, que cruzam e liberam ovos nas fezes.
- Os ovos germinados desenvolvem larvas em estágios pré-infectivos, de vida livre, até a eclosão das mesmas e maturação em estágio infectivo completando o ciclo (CDC, 2013).

Os ancilostomídeos adultos presentes no intestino delgado utilizam-se da hemoglobina como fonte de energia. Assim, hospedeiros com altas cargas parasitárias podem desenvolver quadros de anemia ferropriva, especialmente graves em casos de gestantes e crianças (Diemert *et al.*, 2008).

As infecções por helmintos parasitas fizeram-se presentes no decorrer da evolução dos seres humanos (Cooke, 2009a). Acredita-se que essa coevolução fez com que os helmintos desenvolvessem adaptações às condições fisiológicas, e mecanismos para se esquivarem do ataque imunológico do hospedeiro (Wang *et al.*, 2017). Respostas com perfil Th2 são favoráveis para a sobrevivência e manutenção dos parasitas. Apesar de não estarem bem descritos os fatores que desencadeiam esse perfil de resposta contra infecções helmínticas, sabe-se que os helmintos induzem a geração e proliferação de Treg e de citocinas anti-

inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-25, IL-33 e TGF- $\beta$  (Zaccone e Cooke, 2013; Briggs *et al.*, 2016). Os antígenos de helmintos são capazes imunomodular as células imunológicas tanto da linhagem inata como adaptativa, a induzir a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ . A IL-10, estimulada por agentes infecciosos, tem papel de retardar ou inibir a resposta do hospedeiro, além de limitar os danos aos tecidos (Cooke, 2009b; Briggs *et al.*, 2016). Além disso, esses antígenos propiciam uma resposta Th2 e estimulam a proliferação de células Treg no intuito de manter a infecção (Taghipour *et al.*, 2014; Briggs *et al.*, 2016).

Ademais, pesquisas com infecção de *N. americanus* em humanos mostraram que as células da mucosa de participantes infectados produzem menos IFN- $\gamma$  e IL-17, quando comparadas as células da mucosa de participantes não infectados, apesar de não reduzirem sintomas clínicos da doença (Wammes *et al.*, 2014). Outros trabalhos em ratos mostraram também que a eosinofilia gerada por helmintos podem ativar alternativamente macrófagos, através da secreção aumentada de IL-4 (Wammes *et al.*, 2014).

Estudos com camundongos NOD mostraram que infecções helmínticas podem impedir o desenvolvimento de DM1, inibindo resposta Th1 e induzindo a uma resposta Th2. Tais achados mostram uma linha promissora de terapias profiláticas para pré-diabéticos, ou co-terapias, para amenizar o quadro da doença (Zaccone e Cooke, 2013).

Terapias com helmintos devem, no entanto, ser cuidadosamente monitoradas a fim de se evitar possíveis danos aos indivíduos submetidos a elas. Nesse contexto, terapias com moléculas oriundas de helmintos visam a substituir técnicas de administração de parasitas inteiros (Wammes *et al.*, 2014; Briggs *et al.*, 2016).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais experimentais

Para este estudo foi escolhido o modelo experimental NOD, linhagem de camundongo que desenvolve diabetes autoimune espontaneamente. Os animais foram disponibilizados pelo biotério de produção do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (CECAL).

Fêmeas NOD com seis semanas de idade, e atestado negativo para protozoários e helmintos, foram mantidas em microisoladores durante todo o experimento, sendo as caixas abertas apenas em capela de fluxo laminar.

Os animais foram divididos em grupos Controle (n=15) e tratado (AdEx - n=15). Alocou-se 5 animais por caixa com microisolador. Para minimizar o contato com microrganismos, gaiolas, maravalha, ração e água foram esterilizados. Os camundongos foram cuidados e mantidos em ambiente asséptico. Água e comida estiveram disponíveis *ad libitum*.

A licença para utilização destes animais foi expedida pelo Comitê de Ética em Uso de Animais, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número: 389 / 2012 (Anexo 1).

#### 3.2 Obtenção de extrato bruto a partir de helmintos *Necator americanus*

O extrato bruto de helmintos adultos de *N. americanus* foi preparado previamente e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, do laboratório de Imunologia e Gênômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para a preparação do extrato, *hamsters* foram previamente infectados com 100 larvas infectantes em estágio 3 (L3i) de *N. americanus*, e mantidos infectados por 42 dias quando foram eutanasiados conforme protocolo previamente estabelecido pelo grupo de pesquisa.

Os nematóides adultos foram, cuidadosamente, retirados mecanicamente do intestino do animal e lavados três vezes em tampão fosfato-salino (PBS) contendo antibiótico e antimicótico (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri) para eliminação de resíduos intestinais. Após as lavagens nesta suspensão, os parasitos foram macerados mecanicamente em solução de PBS estéril, seguido por sonicação da solução em Ultrasonil Homegenizier – Cole Parmer, cinco ciclos de um minuto, em uma amplitude de 60 Htz. Cada ciclo foi intercalado com intervalos de 30 segundos. Os tubos foram mantidos em gelo, durante esse processo, para evitar desnaturação das proteínas. Antes da sonicação, cada tubo foi lavado exteriormente com água destilada para esfriar os mesmos.

Em seguida, a solução foi centrifugada em tubo Centricon de 10 KDa (Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts), para concentrar as proteínas, em ciclos de 4.000g, 10 minutos a 4°C. O sobrenadante, onde estão proteínas de interesse, foi recuperado, filtrado em filtro de 0,22 micrometros. As proteínas foram dosadas através do método colorimétrico BCA – Pierce (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). A dosagem final obtida foi ajustada para 1 mg/ml e mantida a -80°C até o uso.

### **3.3 Tratamento com extrato bruto de *N. americanus***

O tratamento dos camundongos NOD consistiu de injeções intraperitoniais três vezes por semana, sendo o grupo AdEx tratado com 100µL de solução contendo 15µg de antígenos de *N. americanus* diluídos em PBS, e o grupo Controle tratado com 100µL de solução inócua de PBS. A duração do tratamento foi de 18 semanas consecutivas.

### **3.4 Aferição de glicose**

A partir da sexta semana de idade foi aferida, semanalmente, a glicose dos animais. Para a aferição de glicose semanal, foi coletada uma gota de sangue da cauda dos animais, preferencialmente no mesmo horário, em capela de fluxo laminar. A gota de sangue foi

colocada em fitas ACCU-Check Active (Roche, Basileia, Suíça), e inseridas no medidor ACCU-Check Active (Roche) para leitura. Os dados foram coletados e anotados para análises posteriores.

### **3.5 Produção de lâminas de esfregaço sanguíneo**

Ulterior à aferição de glicose, também uma gota de sangue da cauda de cada animal foi coletada para esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro polarizadas. Após a secagem das lâminas identificadas, o esfregaço sanguíneo foi corado por Kit Panótico (Laborclin LB, Curitiba, Paraná). A descrição breve deste protocolo de coloração segue os procedimentos: fixação por imersão em solução de triarilmetano 0,1% (cinco vezes), coloração por imersão em solução de xantenos 0,1% (cinco vezes) e coloração por imersão em tiazinas 0,1% (cinco vezes). Após a coloração as lâminas foram, gentilmente, lavadas em água tipo 1 e expostas para secagem a temperatura ambiente.

Esquema representativo do delineamento experimental utilizado Figura 1:

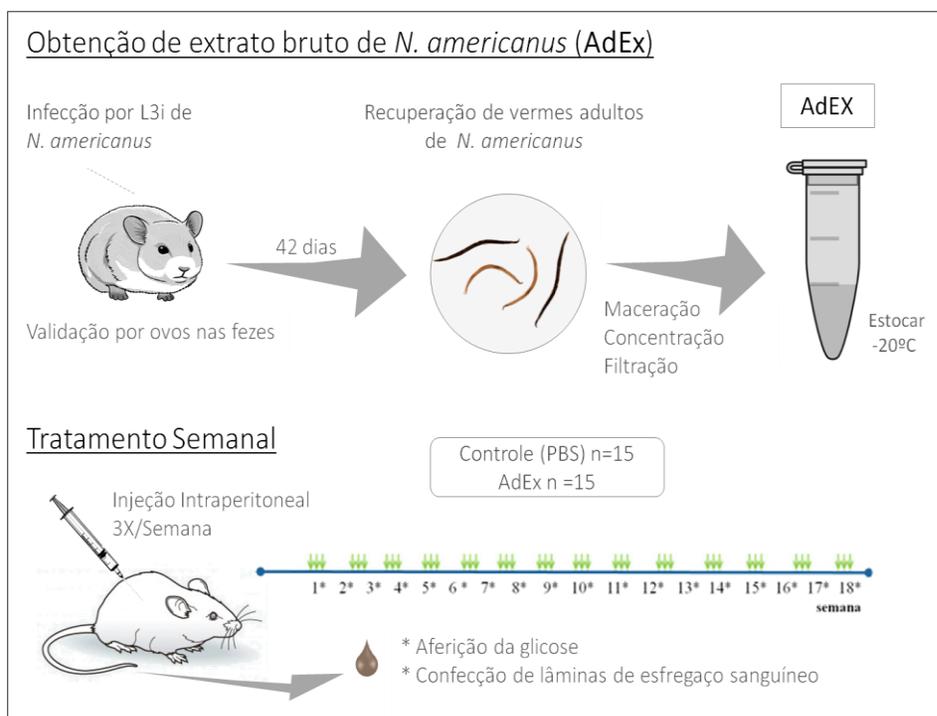


Figura 1: Esquemas experimentais adotados para obtenção de extrato bruto de *N. americanus* e Tratamento semanal dos animais NOD.

### 3.5.1 Análise das lâminas de esfregaço sanguíneo

Em cada lâmina foram realizadas contagens diferenciais relativas e totais de leucócitos, discriminando-se diferenças entre núcleos e grânulos citoplasmáticos presentes em cada tipo celular, conforme parâmetros já estabelecidos (Vanilda e Nascimento, 2014). Os dados foram tabelados de forma pareada para posterior análise.

Das lâminas de esfregaço sanguíneo de cada camundongo foram feitas contagens absolutas (100 células/lâmina) e relativas (20 campos da mesma lâmina) dos leucócitos. Fez-se necessário tal utilizar tal metodologia, visto a impossibilidade de se fazer hemogramas semanais que demandam grandes quantidades de sangue.

### **3.6 Procedimentos de eutanásia dos animais**

Na décima oitava semana de tratamento, os animais foram eutanasiados, em capela de esterilização, por injeção dos anestésicos Cetamina e Xilazina (proporção 1:1) em dose letal, seguindo as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Foi realizada punção cardíaca para retirada do sangue, utilizando seringas de 1ml hipodérmicas. O sangue coletado foi reservado individualmente para posterior retirada do soro. Os animais tiveram seus abdomens higienizados com álcool 80% antes da retirada do baço. O baço removido foi acondicionado em meio de cultura completo (MC) [MC= RPMI 1640 (Gibco, Waltham, Massachusetts) + gentamicina 40µg/ml (Sigma)+ soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas, São Paulo)]. O pâncreas recolhido de cada animal foi acondicionado, individualmente, em solução de formalina 4% tamponada com PBS, para subsequente confecção de blocos de parafina e futura avaliação do infiltrado inflamatório.

#### **3.6.1 Obtenção de soro a partir do sangue**

Os tubos com sangue foram resfriados a 4°C durante 1 hora e centrifugados a 4.000×g por 10 minutos para retirar o soro, sendo posteriormente armazenados a -80°C até a avaliação de citocinas.

##### **3.6.1.1 Dosagem de Citocinas no Soro (CBA)**

O soro recuperado, e mantido a -80°C foi descongelado em gelo, e 25µl das amostras, já centrifugadas, foram dispostas em placa de 96 wells, fundo em 'U' (BD, Franklin Lakes, Nova Jersey). Para a dosagem de citocinas no soro foram utilizados os Kits: BD Citometria Bead Assay (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 e BD Citometria Bead Assay (CBA) Mouse Inflammation. Seguindo o protocolo do fabricante, os padrões de citocinas foram reconstituídos e fez-se a curva padrão com diluições seriadas (TS=5000pg/mL;

1:2=2500pg/mL; 1:4=1250pg/mL; 1:8=625pg/mL; 1:16=312,5pg/mL; 1:32=156pg/mL; 1:64=80pg/mL; 1:128=40pg/mL e 1:256=20pg/mL). Foi adicionado 15µl de mix de beads, e em seguida, reagente PE em todos os poços utilizados. A placa foi incubada por três horas, a temperatura ambiente, em agitador, protegida da luz. Após a incubação, 160µl do reagente de lavagem do kit foi adicionado aos poços, e a placa centrifugada por 10 minutos, a 400×g, 18°C. Cuidadosamente, a placa foi vertida e foi adicionado mais 200µl de reagente de lavagem.

A leitura da placa foi feita na plataforma de citometria do Instituto René Rachou, no citômetro FACSVerse.

### **3.6.1.2 Dosagem de Óxido Nítrico em Soro**

A dosagem de óxido nítrico (NO) no soro dos camundongos, foi feita de forma indireta através da reação de Griess. Essa reação detecta os produtos estáveis da via de síntese de óxido nítrico, o nitrito, mediante a oxidação do NO presente no soro.

Inicialmente, foi feita uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (100µM; 50µM; 12,5µM; 6,25µM; 3,12µM; 1,56µM e 0µM), diluídos em 100µl de álcool absoluto gelado, conforme protocolo previamente estabelecido em nosso grupo. Na sequência, em uma placa de 96 wells, fundo chato, foram colocados 50µl de cada amostra de soro, seguido pelo mesmo volume de solução de Griess (=sulfanilamida 2% diluída em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% e de N-1-naphtylethtylenodiamina –NEED 0,2%, também diluído na solução de sulfanilamida 2% ). A placa foi incubada por 10 minutos, protegida da luz. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm. A absorbância média da duplicata obtidas nas amostras foi comparada às absorbâncias (x) da curva-padrão, e convertidas em concentração (y) utilizando a fórmula:  $y = 139,73x - 7,3076$ .

### 3.6.2 Recuperação de esplenócitos

Os baços foram, individualmente, macerados e passados no filtro Cell-strainer 70 micróns (BD BioSciences), para remoção de partículas maiores. Nas células recuperadas foi acrescentado 10ml de MC e foram centrifugadas a 350×g 4°C por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 9ml de água destilada estéril, sendo imediatamente acrescentado 1ml de PBS 10X estéril, para lise de hemácias. Os tubos foram novamente centrifugados a 350g 4°C por 10 minutos, e as células ressuspensas em 1ml de MC para contagem em câmara de Neubauer, na diluição de 1:20 (10µL de solução com células em 190µL de solução de Turk). As células foram diluídas para concentração  $1 \times 10^6$  células/80µL, distribuídas em placas de 96 poços (fundo U) e incubadas por 4 horas em 20µL de solução contendo Brefeldina A (10µg) (Sigma), PMA (5µg) (Sigma) e ionomicina (50µg) (Sigma). Após a incubação, as placas com células foram centrifugadas 350×g 4°C por 10 minutos e 50µL do sobrenadante de cada animal foram retirados e colocados em placas de 96 poços de fundo chato, congeladas a -20°C, até o uso e posterior avaliação da produção de óxido nítrico.

O restante dos esplenócitos não plaqueados foi centrifugado individualmente por 10 minutos a 10.000×g, o sobrenadante foi removido e 1mL de solução Trizol foi colocado por tubo. Os tubos foram armazenados em freezer -80°C para posterior avaliação da expressão gênica.

#### 3.6.2.1 Marcação dos esplenócitos para citometria de fluxo

Após as quatro horas de incubação, os esplenócitos, em placa de 96 poços, foram lavados duas vezes a 350×g 10 minutos 4°C em PBS para remoção de MC. Após a lavagem, foram acrescentados 200µl de solução bloqueadora da porção Fc (BD Biosciences) e as células foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Anticorpos para a marcação de moléculas de superfície foram acrescentados de acordo com diluição prévia determinada no volume de 20µL/poço diluídos em solução PBS-wash (BSA 5% em PBS).

Células foram incubadas por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS a 350g 10 minutos a 4°C. Ao *pellet* foi acrescentada solução de formaldeído a 4% em PBS e as células foram incubadas por 20 minutos com posterior lavagem 2 vezes com PBS a 350×g 10 minutos 4°C. Células foram então incubadas com solução permeabilizante de saponina 0,5% em PBS-W (PBS-P) por 30 minutos seguidas de centrifugação a 350g 10 minutos a 4°C. Para a marcação de citocinas intracitoplasmáticas, anticorpos anti-citocinas foram diluídos em solução permeabilizante de acordo com concentrações previamente estabelecidas. Foi acrescentado 20µL de solução de anticorpo por poço, contendo esplenócitos. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com solução permeabilizante (PBS-P) e mais 2 vezes com PBS a 350g 10 minutos 4°C. A leitura em citômetro de fluxo (Fortessa – BD Biosciences) foi realizada no dia seguinte e calibração foi feita com calibrantes (BD Biosciences) por técnico especializado.

#### **3.6.2.1.1 Anticorpos utilizados**

Para a marcação dos esplenócitos e das citocinas foram usados os anticorpos listados na Tabela 3, acoplados aos seus respectivos fluorocromos. O comprimento de onda indica a faixa de cor emitida pelo fluorocromo após excitação com laser. A concentração de cada anticorpo utilizado foi determinada anteriormente em nosso laboratório (Tabela 2).

Tabela 2: Anticorpos utilizados para marcação de esplenócitos

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Comprimento de Onda emitido</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-CD3	FITC	600nm	BioLegend
Anti-CD4	PerCPCy 5.5	3000nm	BioLegend
Anti-CD8	BV 421	500nm	BioLegend
Anti-CD62L	BV510	2000nm	BioLegend
Anti-CD3	AF 700	200nm	BioLegend
Anti-CD25	APC-Cy7	200nm	BioLegend
Anti-F4/80	FITC	700nm	BioLegend
Anti-IFN- $\gamma$	P.E.	575nm	BioLegend
Anti-IL4	P.E.	575nm	BioLegend
Anti-IL5	P.E.	575nm	BioLegend
Anti-IL10	P.E.	575nm	BioLegend
Anti-IL12	P.E.	575nm	BioLegend
Anti-IL17	P.E.	575nm	BioLegend
Anti-TNF- $\alpha$	P.E.	575nm	BioLegend

### **3.6.2.1.2 Análise dos dados a partir do citômetro de fluxo**

Os dados gerados pela leitura no citômetro de fluxo foram analisados pelo programa FlowJo 10.0. A análise percorreu o seguinte protocolo: FSC-H versus FSC-A (largura Vs. Altura), onde as células foram selecionadas para inclusão de células únicas (singlets). Desta seleção, as células foram então distribuídas por tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), e feita seleção para mononucleares. Estas células foram então analisadas de acordo com o anticorpo utilizado e levando em consideração controle negativo de fluorescência.

### **3.6.2.2 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de esplenócitos**

A dosagem de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura primária de esplenócitos também foi feita de forma indireta, através da reação de Griess.

Uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (100 $\mu$ M; 50 $\mu$ M; 12,5 $\mu$ M; 6,25 $\mu$ M; 3,12 $\mu$ M; 1,56 $\mu$ M e 0 $\mu$ M), foi feita usando-se como diluente RPMI. Na sequência, em uma placa de 96 wells fundo chato, foram colocados 25 $\mu$ l de cada amostra de sobrenadante (em meio de cultura RPMI), seguido pelo mesmo volume de solução de Griess (=sulfanilamida 2% diluída em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% e de NEED 0,2%, também diluído na solução de sulfanilamida 2% ). A placa foi incubada por 10 minutos protegida da luz. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm. A absorbância média da duplicata obtidas nas amostras foi comparada às absorbâncias (x) da curva-padrão, e convertidas em concentração(y) utilizando a fórmula  $y = 139,73x - 7,3076$ .

### **3.6.2.3 Análise da expressão de citocinas em esplenócitos por Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real**

A fim de se investigar a expressão gênica de citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17, nos diferentes grupos, foram feitos ensaios de qRT-PCR. Para tanto, foi adicionado Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) a uma porção dos esplenócitos em cultura. O RNA dos mesmos foi extraído seguindo instruções do fabricante. Ao final do protocolo, a concentração do RNA extraído foi estimada por leitura em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts), a 260nm. As razões 260 /230 e 260 /280, que indicam a qualidade do RNA, também foram observadas (~1.8 e 2.0).

Na sequência, as amostras foram tratadas com DNase (RQI, Promega) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. Em seguida, a reação de transcrição reversa foi feita utilizando todo o volume de RNA tratado com DNase (10µl), enzima transcriptase reversa (Super Script II, Invitrogen) e Random Primers (Promega, Madison, Wisconsin), em um volume final de 20µl. As etapas de incubação, bem como os ciclos e suas temperaturas foram seguidos de acordo com as recomendações do fabricante.

Tendo em mãos cDNA das amostras, o ensaio de qRT-PCR foi feito utilizando os primers (Tabela 3):

Tabela 3: Genes testados pela técnica de qRT-PCR. Conjuntos de primers (5' → 3') empregados na reação de amplificação

Gene	Foward	Reverse	Tamanho do amplicon
<i>β-act</i>	TTGTTACCAACTGGGACGAC	ACGGTTGGCCTTAGGGTT	125
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	CGGCTGACCTAGAGAAGACA	GTAACAGCCAGAAACAGCCA	160
<i>IL-17<sup>a</sup></i>	AGGCCCTCAGACTACCTCAA	CAGGATCTCTTGCTGGATGA	177
<i>TGF</i>	TTTAGGAAGGACCTGGGTTG	CTTGCGACCCACGTAGTAGA	216
<i>iNOS</i>	TGGCTGTGCTCCATAGTTTC	TTCAACATCTCCTGGTGGAA	187
<i>IL-12<sup>a</sup></i>	CTTTGATGATGACCCTGTGC	GCAGAGTCTCGCCATTATGA	183
<i>IL-5</i>	GCTGGCCTCAAACCTGGTAAT	TGGTAACATGCACAAAGCCT	152
<i>IL-13</i>	ACTGCAGTCCTGGCTCTTG	GAGGCCATGCAATATCCTCT	261
<i>IL-22</i>	GACAGGTTCCAGCCCTACAT	ATCGCCTTGATCTCTCCACT	167
<i>IL-33</i>	GCTTCCAACCTGAAGAAAGGG	GGAAAGAGCAAGGCTGAATC	186
<i>IL-21</i>	AAATGCCCTTCCTGTGATTC	CTGCATTCGTGAGCGTCTAT	191
<i>Arg</i>	GGTTCTGGGAGGCCTATCTT	AAGCAAGCCAAGGTTAAAGC	171
<i>Retl<math>\alpha</math></i>	GTCCTGGAACCTTTCCTGAG	AGCTGGATTGGCAAGAAGTT	180
<i>IL-27</i>	TGGGATACCATCTTCCCAAT	GCTCCCTCTCTGAGCTGGT	159
<i>IL-10</i>	TAAGGGTTACTTGGGTTGCC	TCACTCTTCACCTGCTCCAC	213

As amplificações por PCR foram feitas em duplicata, usando 10ng de cDNA por reação. Além desses, foram adicionados os primers, o reagente SyBR Green para PCR em tempo real, num volume final de 15 $\mu$ l por reação.

As condições da reação foram 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos e 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As leituras de fluorescência foram realizadas pelo equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) e, posteriormente, analisados pelo Step One Software (Applied Biosystems).

### **3.6.5 Histologia das amostras pancreáticas**

#### **3.6.5.1 Confeção de lâminas coradas com método Hematoxilina-Eosina (H.E.)**

As amostras de pâncreas dos camundongos, já fixados em formalina tamponada, foram submetidos à parafinização e emblocamento, seguindo as etapas: Formol 10%, 1 hora; uma passagem em álcool etílico 70%, 1 hora; duas passagens em álcool etílico por uma hora; uma passagem em álcool absoluto, por uma hora; uma passagem em acetado de butila; três passagens em xilol, por uma hora; parafina a 65°C por uma hora e parafina a 60°C por uma hora.

Dos blocos já parafinizados foram feitos cortes de 4µm em micrótomo, colocados em lâminas comuns para microscopia. As lâminas, previamente identificadas, foram mantidas em estufa a 65°C, por 45 minutos, seguidas de duas etapas de 10 minutos em xilol para desparafinização. Logo, as lâminas foram submetidas às etapas de hidratação que consistiram em banhos em álcool etílicos (absoluto I, absoluto II, 80%, 70% e 50%, e finalmente água corrente) durante 5 minutos cada.

Para coloração, as lâminas foram submersas em hematoxilina por 5 minutos, e lavadas em água corrente por 3 minutos. Em seguida, foram submersas em eosina por 3 minutos e lavadas em água corrente por um minuto.

Os cortes foram, então, desidratados em banhos sequenciais de álcoois (70%, absoluto I, absoluto II). Para fixação do corante, mais dois banhos de xilol de 5 e 10 minutos.

Finalizado o processo de coloração, aplicou-se uma lamínula em cada uma das lâminas, seladas com cola especial (Entellan – Meck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA).

As lâminas de amostras pancreáticas foram analisadas observando-se a morfologia das ilhotas e a presença de infiltrado inflamatório. As ilhotas foram classificadas de forma qualitativa: A) Sem insulite; B) Insulite moderada C) Perinsulite D) Insulite Severa, conforme adaptação da técnica de Ukah, 2017 (Figura 2).

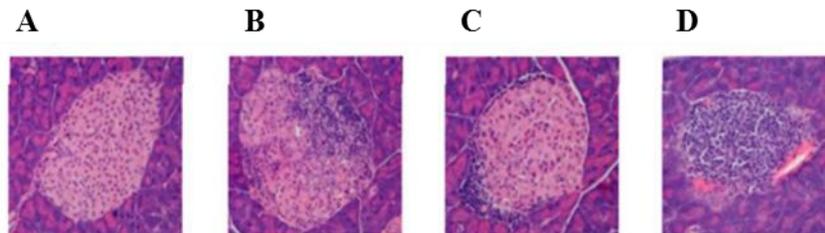


Figura 2: **Painel de seções pancreáticas com enfoque nas ilhotas.** As figuras mostram, respectivamente, uma ilhota saudável (2A), uma ilhota com insulite moderada (2B), peri-insulite na ilhota (2C) e ilhota já bem destruída pelo infiltrado inflamatório (2D). Adaptado de Ukah, 2017.

### 3.6.5.2 Imuno-histoquímica das amostras de pâncreas

As amostras de pâncreas dos camundongos, já fixados em formalina tamponada, foram submetidos à parafinização e emblocamento, seguindo as etapas: Formol 10%, 1 hora; uma passagem em álcool etílico 70%, 1 hora; duas passagens em álcool etílico por uma hora; uma passagem em álcool absoluto, por uma hora; uma passagem em acetado de butila; três passagens em xilol, por uma hora; parafina a 65°C por uma hora e parafina a 60°C por uma hora.

Dos blocos, foram feitos cortes de 4µm em micrótomo, colocados em lâminas para imuno-histoquímica (ImmunoSlide, Ulster, Reino Unido). Os cortes foram, então, desparafinizados em estufa a 65°C por, pelo menos, 8 horas. A desparafinização seguiu com dois banhos de xilol (20 e 6 minutos, respectivamente) e dois banhos em álcool absoluto (10 minutos e 15 segundos, respectivamente). A próxima etapa foi a recuperação antigênica, onde as lâminas foram submetidas à imersão em tampão citrato (pH 6,0), em panela de vapor (CuisinArt) por 40 minutos (aproximadamente 95°C). A imunomarcagem foi feita utilizando o Sistema de detecção do Polímero Novolink (Leica, Wetzlar, Alemanha). Logo, as demais etapas, incubações e lavagens seguiram as instruções do fabricante. Após resfriamento, foram feitas as etapas de bloqueio de peroxidase endógena (5 minutos); bloqueio de proteínas (PBS, BSA 2% + Tween 20 0,1% por 15 minutos), incubação com anticorpo primário, bloqueio com anticorpo pós-primário (30 minutos), reação do polímero (anticorpo secundário – 30 minutos), detecção por sistema DAB (3,3'-

diaminobenzidina por 3 minutos), e finalmente, contra coloração dos cortes por hematoxilina (5 minutos). O período de incubação com anticorpo primário diferiu-se entre os anticorpos, sendo adotado o período de incubação de uma hora para anticorpo primário anti-insulina (clone T56-706, BD Bioscience, Hampton, Nova Hampshire) a temperatura ambiente, e incubação *overnight*, a 4°C para os anticorpos primários anti-CD4 (clone H129.19, BD Bioscience), anti-CD8 (clone 53-6.7, BD Bioscience) e anti-F4/80 (clone T45-2342, BD Bioscience), conforme padronização prévia em nosso laboratório. Foi utilizado o anticorpo pós-primário do kit para marcação anti-insulina (coelho anti-IgG de camundongo) e para os demais anticorpos primários foi utilizado o anticorpo coelho anti-IgG de rato (clone ab6703, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Uma vez feitas as marcações, os cortes foram cobertos por lamínulas.

A técnica de imuno-química nestas amostras de pâncreas não funcionou. As marcações utilizando tais anticorpos apresentaram alto marcação de fundo e muitas marcações inespecíficas.

### **3.7 Análise estatística dos dados**

Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, Estados Unidos). Para comparação dos dados entre os grupos PBS e AdEX da curva glicêmica, contagem leucocitária relativa e diferencial foi utilizado o teste T com múltiplas comparações com correção de Holm-Sidak. Para análise da diferença nos esplenócitos dos grupos PBS e AdEX, foi utilizado o teste não paramétrico não pareado de Mann-Whitney. Correlações entre os índices glicêmicos e os esplenócitos foram analisadas através da Correlação não paramétrica de Spearman. Intervalo de confiança foi de 95% sendo considerados estatisticamente significantes valores de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 A glicemia dos animais não foi alterada pelo tratamento com extrato bruto de *N. americanus*

Os valores de glicose mensurados a cada semana foram agrupados em um gráfico *heatmap* (Figura 3). O *heatmap* foi traçado comparando os valores de glicemia semanais de cada animal ao valor de glicemia na semana 0 em porcentagem. Neste gráfico valores próximos ao da semana zero (até 20%) estão representados em verde, quanto maior a diferença em relação à mesma semana maior a intensidade de vermelho representada.

Pelo gráfico pôde-se observar um menor número de quadrantes vermelhos no grupo tratado com extrato bruto (Figura 3B), comparado ao grupo grupo Controle, tratado com extrato bruto (Figura 3A). Contudo, a análise da curva de glicemia pelo programa de análise o teste T com múltiplas comparações com correção de Holm-Sidak ( $P < 0,05$ ), mostrou que as diferenças, visualmente observadas, não foram significativas (Figura 4).

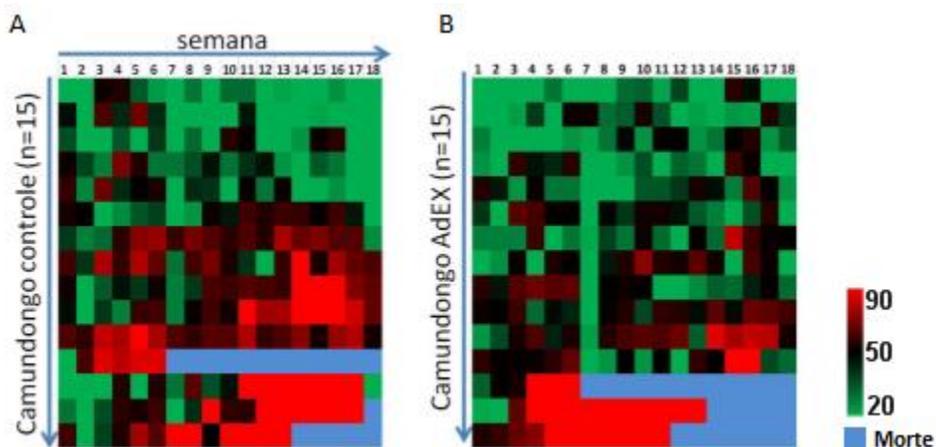


Figura 3 - **Heatmap dos valores de percentil de glicemia.** Grupos Controle (A) e AdEX. (B). O gráfico mostra a evolução dos níveis de glicemia de cada camundongo no decorrer das semanas comparados à semana

0 (zero). Os valores ilustrados são dados em percentil. Os quadros azuis indicam ausência de valor devido à morte do animal.

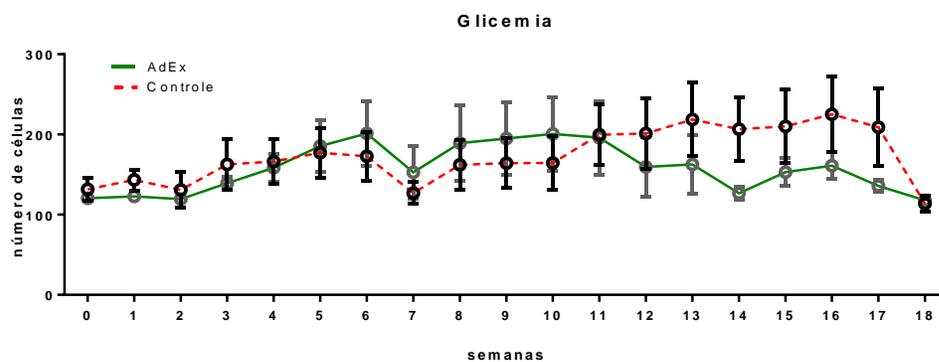


Figura 4 - Curva dos valores de glicemia mensurados semanalmente. Valores representam médias dos grupos Controle e AdEX.

## 4.2 Tratamento com extrato bruto de *N. americanus* altera níveis de leucócitos em sangue de camundongos NOD

Das lâminas de esfregaço sanguíneo de cada camundongo foram feitas contagens absolutas, contando 100 células/lâmina, e relativas, contagem dos leucócitos em 20 campos da mesma lâmina. Fez-se necessário utilizar tal metodologia, visto a impossibilidade de se fazer hemogramas semanais que demandam grandes quantidades de sangue.

Todas as análises estatísticas foram feitas a partir do teste T, com múltiplas comparações com correção de Holm-Sidak. O intervalo de confiança foi de 95% sendo considerados estatisticamente significantes valores de  $p < 0,05$ . As barras representam o erro do desvio padrão da média, e os círculos o valor da média do grupo na respectiva semana.

### 4.2.1 Linfócitos

Durante o curso do experimento, foram observadas diferenças significativas na contagem absoluta de linfócitos apenas na semana 16 (Figura 5A), sendo o número de linfócitos circulantes maior no grupo AdEX. Apesar de não terem sido observadas diferenças em outras semanas, a contagem absoluta dessas células aponta um maior número de linfócitos a partir da 10ª semana no grupo AdEX.

Na contagem relativa, foram observados aumentos significativos no número de linfócitos nas semanas 6, 7 e 10, no grupo Controle (Figura 5B). Pela contagem relativa, o grupo Controle manteve números de linfócitos, ligeiramente, maiores do que o grupo AdEX a partir da 2ª semana de experimento (Figura 5B).

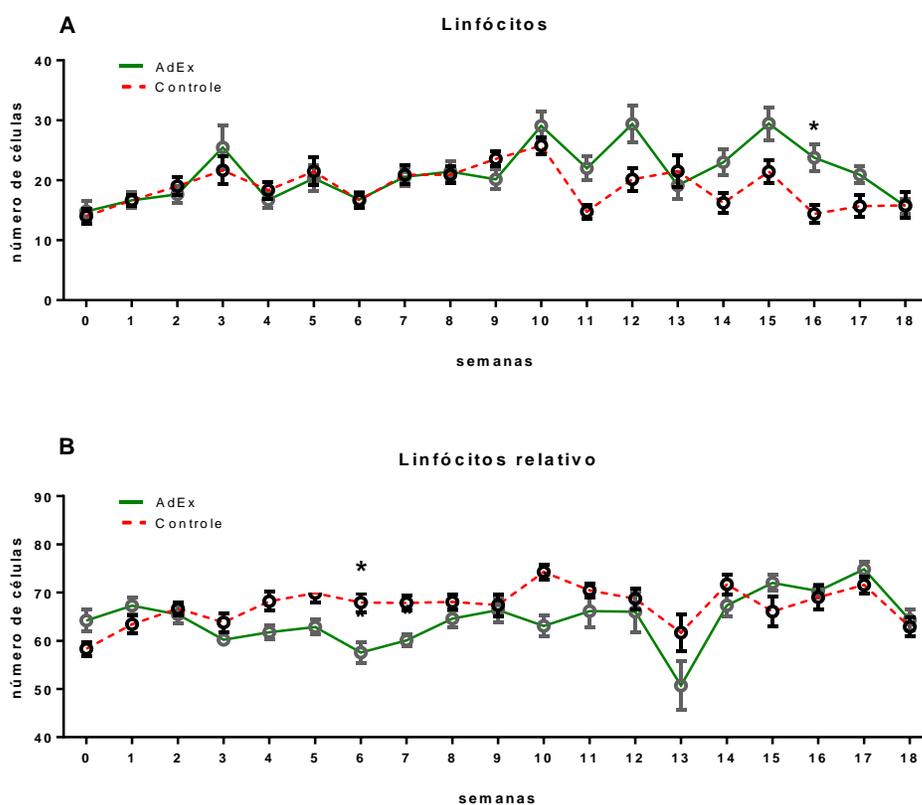


Figura 5 – Efeito do tratamento com extrato bruto de *N. americanus* em camundongos NOD em linfócitos circulantes. Curva dos valores médios semanais dos números absolutos (A) e relativos (B) de linfócitos dos grupos Controle e AdEX. O asterisco assinala a semana com valor  $p < 0,05$  (Figura 5A – Semana 16:  $p = 0,0016$ . Figura 5B - Semana 6:  $p = 0,0012$ ; Semana 7:  $p = 0,0008$ ; Semana 10:  $p = 0,003$ ).

### 4.2.2 Eosinófilos

Foram observadas diferenças significativas na contagem absoluta de eosinófilos nas semanas 3, 6, 7 e 11 (Figura 6A), enquanto na contagem relativa foram observadas diferenças nas semanas 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17 e 18 (Figura 6B).

Na maioria das semanas de tratamento, os números de eosinófilos do grupo AdEX se manteve maior do que os números de eosinófilos do grupo Controle, tanto na contagem absoluta como na contagem relativa (Figura 6A e B).

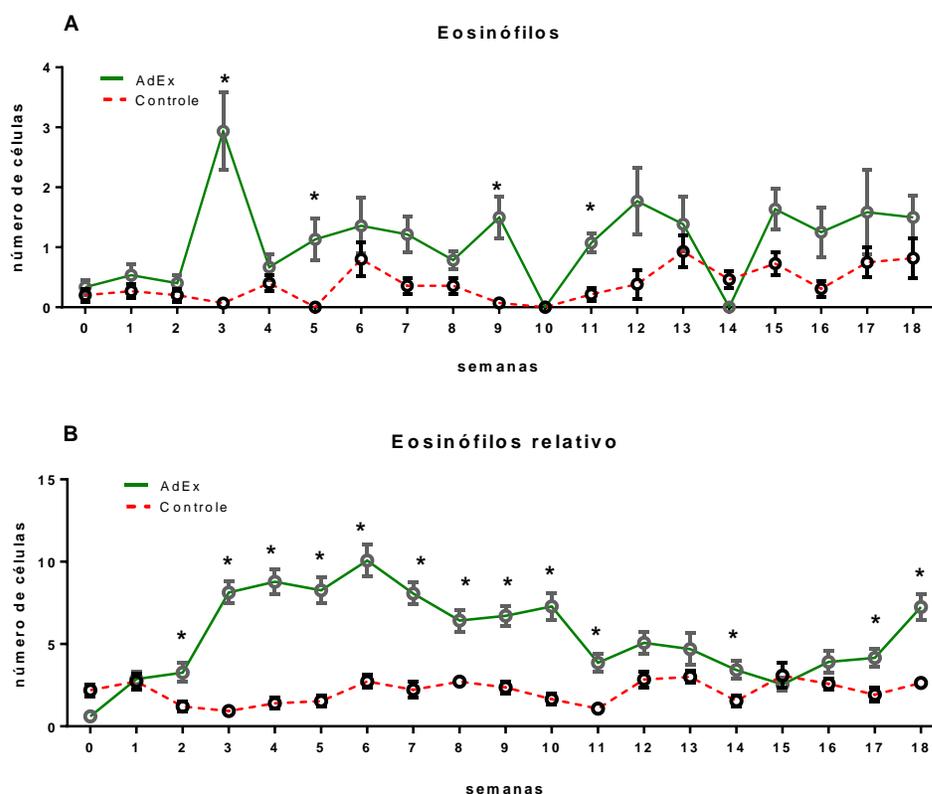


Figura 6 - Efeito do tratamento com extrato bruto de *N. americanus* em camundongos NOD em eosinófilos circulantes. Curvas dos valores médios semanais dos números absolutos (A) e relativos (B) de eosinófilos dos grupos Controle e AdEX. Os asteriscos assinalam as semanas com valores  $p < 0,05$  (Figura 2A – Semana 3:  $p = 0,0001$ ; Semana 5:  $p = 0,0031$ ; Semana 9:  $p = 0,0004$ ; Semana 11:  $p = 0,0002$ . Figura 2B – Semana 0:  $p = 0,0006$ ; Semana 2:  $p = 0,0040$ ; Semana 3:  $p < 0,001$ ; Semana 4:  $p < 0,001$ ; Semana 5:  $p < 0,001$ ; Semana 6:  $p < 0,001$ ; Semana 7:  $p < 0,001$ ; Semana 8:  $p < 0,001$ ; Semana 9:  $p < 0,001$ ; Semana 10:  $p < 0,001$ ; Semana 11:  $p < 0,001$ ; Semana 14:  $p = 0,0063$ ; Semana 17:  $p = 0,0045$ ; Semana 18:  $p < 0,001$ ).

### 4.2.3 Leucometria Total Absoluta

Foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na contagem total de leucócitos das semanas 11 e 12 (Figura 7). Pelo gráfico de leucometria total, pode-se observar que a partir da 11ª semana, houve maiores números de células no grupo tratado com antígenos (AdEX), excetuando-se a 13ª e 18ª semanas, onde os números apresentaram-se semelhantes (Figura 7).

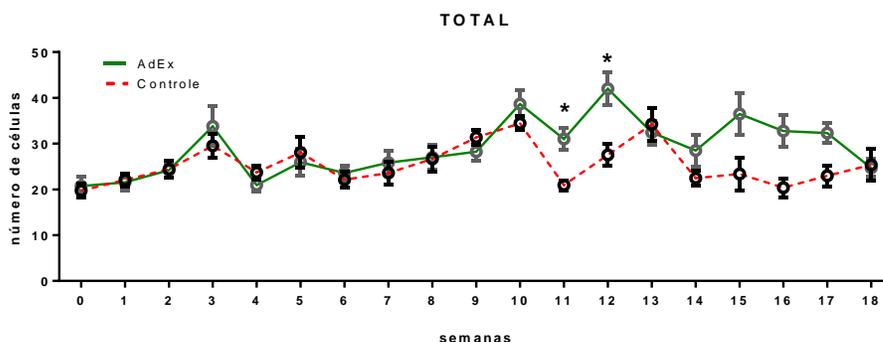


Figura 7 - Efeito do tratamento com extrato bruto de *N. americanus* em camundongos NOD em leucócitos circulantes. Curvas dos valores médios semanais de leucometria absoluta dos grupos Controle e AdEX. Os asteriscos assinalam as semanas com valores  $p < 0,05$  ( $N = 30$ ; Semana 11:  $p = 0,0008$ . Semana 12:  $p = 0,0027$ ).

### 4.3 Tratamento com extrato bruto de *N. americanus* aumenta número de linfócitos e macrófagos produtores de IL-4 e IL-10

Para caracterização dos leucócitos no baço, os esplenócitos em cultura foram marcados com anticorpos de superfície. Os mesmos foram também marcados por anticorpos

intracelulares para avaliação da produção de citocinas. Com esses dois tipos de marcação foi possível determinar, quantitativamente, quais tipos celulares estavam produzindo as citocinas investigadas.

#### 4.3.1 Linfócitos T CD4+

As marcações com anticorpos mostraram que no grupo tratado com extrato bruto (AdEx) há mais linfócitos T CD4+ produzindo IL-4 (Figura 8A) e IL-10 (Figura 8B), do que no grupo tratado apenas com PBS (Controle). Não foi constatada significância, entre os grupos Controle e AdEX, quando comparadas as quantidade de células T CD4+ que produzem IFN-  $\gamma$ , TNF, IL-5 e IL-17.

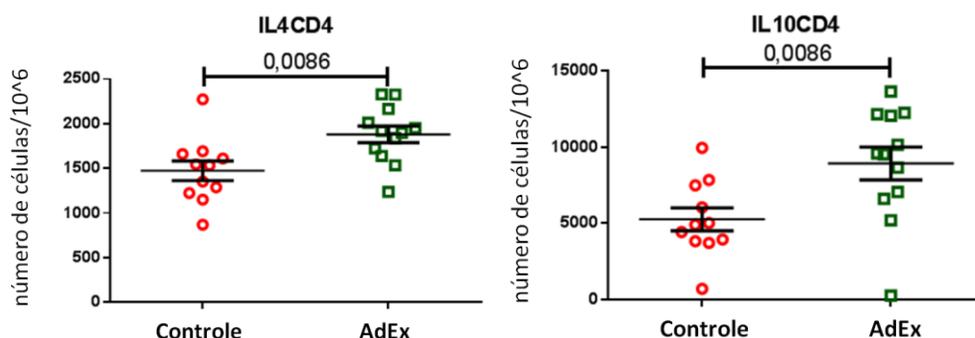


Figura 8 – Tratamento com extrato bruto aumenta número de linfócitos T CD4+ produtores de IL-4 e IL-10. Células T CD4+ produzindo interleucina 5 (A) e 10 (B), entre os grupos controle e AdEX. Grupo Controle: N = 11; Grupo AdEX: N = 12. Teste não paramétrico não pareado de Mann-Whitney, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2 Linfócitos T CD4+CD25+

No grupo AdEx também foi observado um maior número de linfócitos T CD4+CD25+ produzindo IL-10 (Figura 9A) quando comparado ao grupo Controle. Não foi observada

significância entre os grupos Controle e AdEX quando comparadas as quantidades de células T CD4+ CD25+ que produzem IFN-  $\gamma$ , TNF, IL-5 e IL-17.

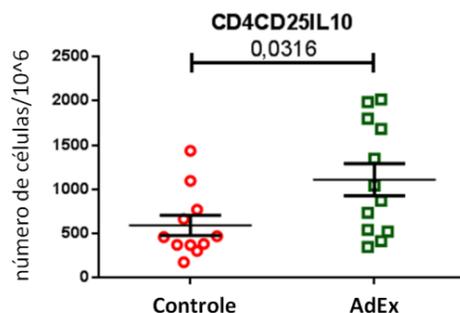


Figura 9 - **Tratamento com extrato bruto aumenta número de linfócitos T CD4+CD25+ produtores de IL-4 e IL-10.** CD4+CD25+ produzindo interleucina 10, entre os grupos controle e AdEX. Grupo Controle: N = 11; Grupo AdEX: N = 12 (IL-10).

#### 4.3.3 Linfócitos T CD8+

Resultado semelhante aos linfócitos T CD4+ foi observado também em linfócitos T CD8+, do grupo tratado com antígenos (AdEX), que exibiram maior quantidade dessas células produzindo IL-4 (Figura 10A) e IL-10 (Figura 10B), comparados aos mesmos linfócitos do grupo Controle. Não se observou significância entre os dados dos grupos Controle e AdEX quando comparadas as quantidades de células T CD8+ que produzem IFN-  $\gamma$ , TNF, IL-5 e IL-17.

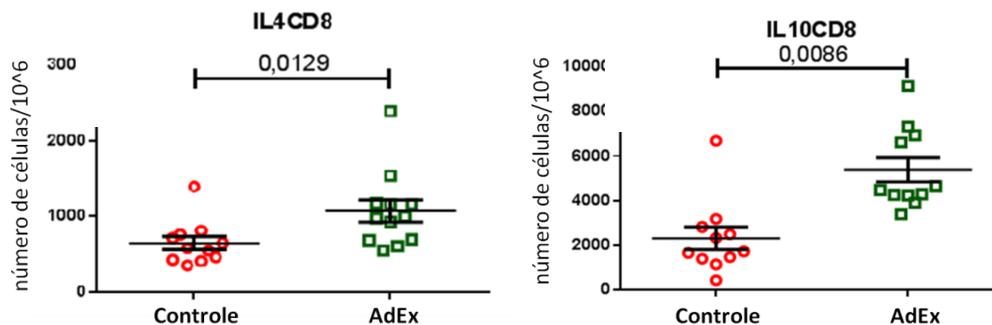


Figura 10 - **Tratamento com extrato bruto aumenta número de linfócitos T CD8+ produtores de IL-4 e IL-10.** Comparação quantitativa de linfócitos T CD8+, produzindo interleucina 4(A) e 10(B), entre os grupos controle e AdEX. Grupo Controle: N = 11; Grupo AdEX: N = 12.

#### 4.3.4 Macrófagos

Quanto à população de macrófagos presentes no baço, foram observados que animais do grupo AdEX exibiram maior número de células produzindo IL-10 quando comparados ao grupo Controle (Figura 11). Não se observou significância entre os grupos Controle e AdEX quando comparadas as quantidades de macrófagos que produzem TNF e IL-17.

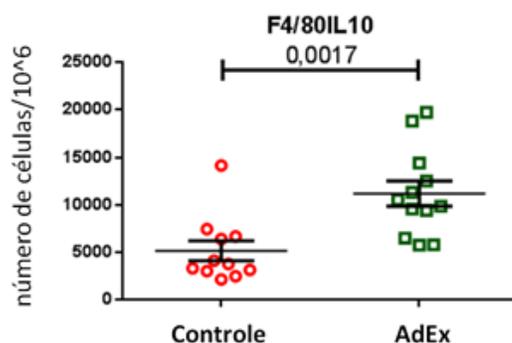


Figura 11 - **Tratamento com extrato bruto aumenta número de macrófagos produtores de IL-10.** Comparação quantitativa de macrófagos produtores de interleucina 10, entre os grupos controle e AdEX. Grupo Controle: N = 11; Grupo AdEX: N = 12.

#### **4.4 Correlações negativas entre glicemia e citocinas produzidas pelos animais tratados com extrato bruto de *N. americanus***

A fim de se investigar se as citocinas, produzidas pelos leucócitos, influenciaram nas taxas de glicose, foram cruzados os dados de glicemia semanal com os dados de citometria de fluxo. Os gráficos gerados foram analisados pelo método estatístico de Correlação não paramétrica de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  foram, estatisticamente, considerados significativos.

Foram observadas correlações negativas entre os níveis de glicemia e a produção de IL-4 por linfócitos T CD4+ ( $r = -0,6714$ ;  $p = 0,0183$ ) e T CD8+ ( $r = -0,6749$ ;  $p = 0,0174$ ), bem como correlação negativa entre os níveis de glicemia e produção de IL-10 por linfócitos T CD4+ ( $r = -0,6797$ ;  $p = 0,0264$ ) em animais tratados com extrato bruto, na 17<sup>a</sup> semana, conforme mostra a Figura 12.

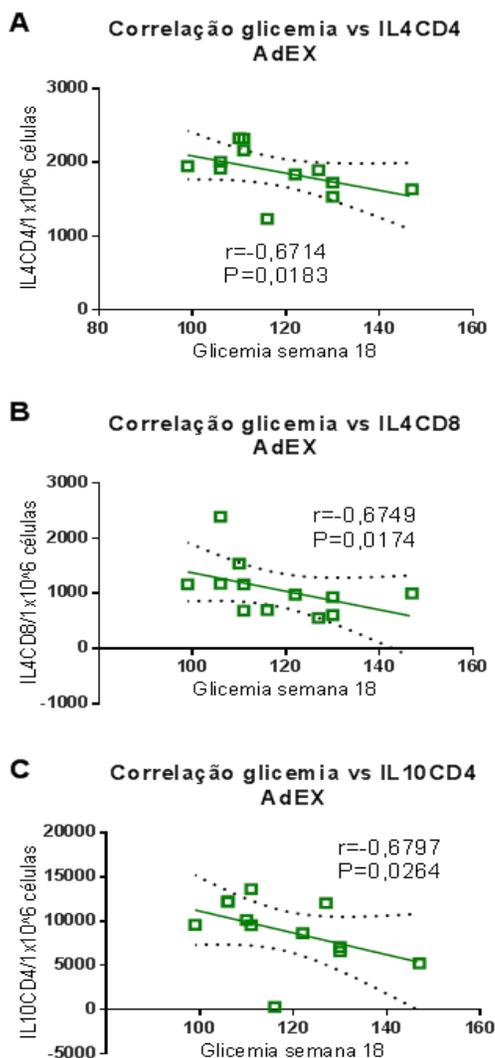


Figura 12 – Correlações negativas dos níveis de glicose (semana 17) e populações celulares produtoras de citocinas no grupo tratado com AdEX. IL4 (A) e IL10 (B) produzida por células T CD4+, e IL4 (C) produzida por células T CD8+. Maiores quantidades dessas interleucinas reduzem os níveis de glicemia em animais tratados com extrato bruto.

#### 4.5 Tratamento com extrato bruto de *N. americanus* diminuiu produção de óxido nítrico

Por meio da reação de Griess, foram dosados o óxido nítrico no soro e no sobrenadante de cultura de esplenócitos.

Foram observadas menores quantidades de óxido nítrico no soro de animais do grupo tratado AdEx, quando comparadas aos animais do grupo Controle (Figura 13).

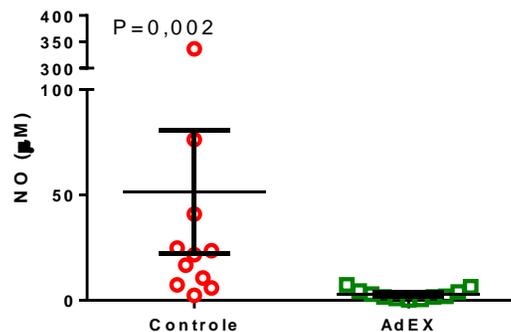


Figura 13 – Animais tratados com extrato bruto de *N. americanus* apresentaram menores quantidades de NO no soro. Valores representam a média dos valores dos animais com desvio padrão. Grupo Controle: N=11 e Grupo AdEx: N= 12.

Em conformidade com os dados do soro, também no sobrenadante de cultura de esplenócitos dos animais do grupo AdEx foram encontradas menores quantidades de óxido nítrico (Figura 14).

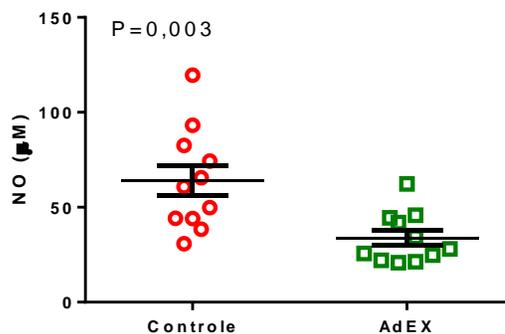


Figura 14 - Sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais tratados com extrato bruto de *N. americanus* apresentaram menores quantidades de NO. Valores representam a média dos valores dos animais com desvio padrão. Grupo Controle: N=11 e Grupo AdEx: N= 12.

#### **4.6 Tratamento com extrato bruto de *N. americanus* alterou a produção de citocinas**

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas dosagens das citocinas: IL-2 (Figura 15A), IFN- $\gamma$  (Figura 15B), IL-12 (Figura 15C), IL-6 (Figura 15D), IL-4 (Figura 15E) e IL-10 (Figura 15F) quando comparados os grupos AdEx e Controle. Nas dosagens de todas as citocinas já mencionadas, as quantidades dessas moléculas circulantes no plasma estavam aumentadas no grupo AdEx. Não foram observadas diferenças, estatisticamente, significativas nas dosagens das citocinas IL17a, TNF- $\alpha$  e MCP1.

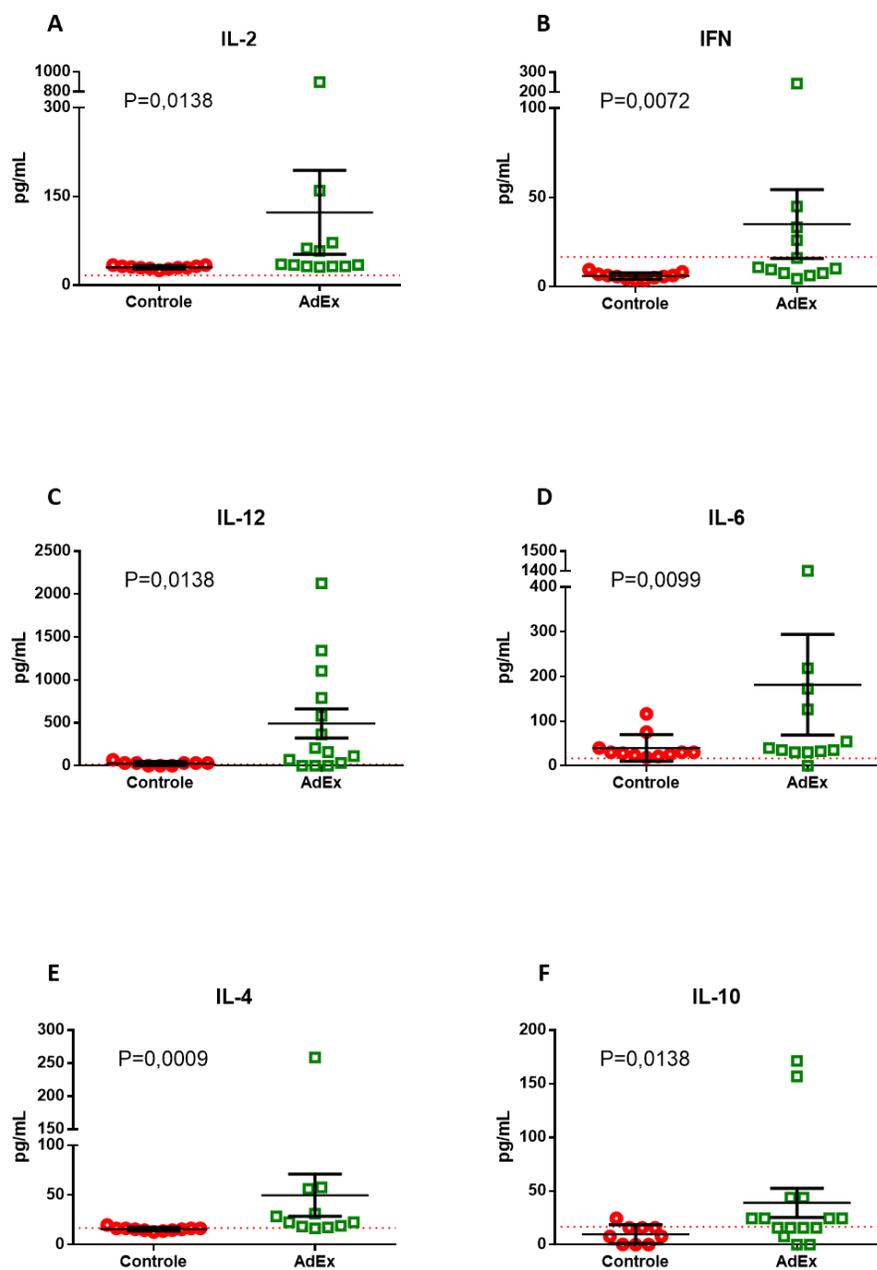


Figura 15 – Tratamento com extrato bruto de *N. americanus* aumenta produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Grupo Controle: N=11 e Grupo AdEx: N= 12.

## 4.7 Animais tratados com AdEx apresentaram menos ilhotas com infiltrado inflamatório na análise Histologia das amostras de pâncreas

### 4.7.1 Lâminas Coradas por H.E.

Com a avaliação das lâminas coradas por H.E. pode-se observar que os animais tratados com extrato bruto de helminto apresentavam maior número e tamanho de ilhotas quando comparadas ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4: Relação número e classificação de ilhotas por grupo de animais após 18 semanas de tratamento:

	<b>Controle n=11</b>	<b>AdEx n=12</b>
Nº de animais	11	12
Total Ilhotas	27	52
Sem insulite	8	22
Insulite Moderada	3	8
Perinsulite	5	6
Insulite Severa	11	16
Média de ilhotas por animal	2,4	4,3

Também observou-se que no grupo AdEx mais de 42% dos animais ainda não apresentavam infiltrado inflamatório em suas ilhotas, enquanto que no grupo Controle quase 41% dos animais apresentavam insulite severa (Figura 16).

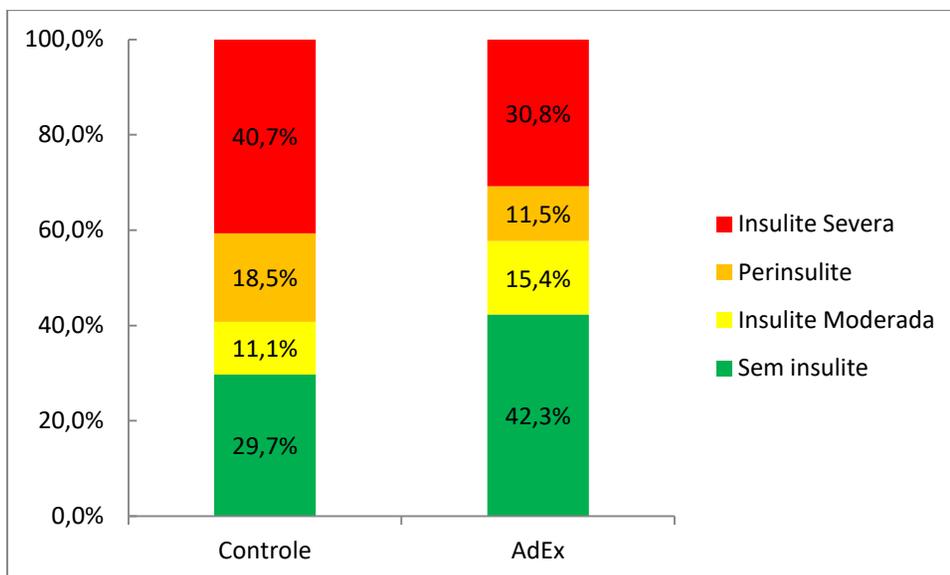


Figura 16: Gravidade do infiltrado inflamatório encontrado nas ilhotas pancreáticas dos grupos Controle e AdEx ao final de 18 semanas de tratamento. Grupo Controle n=11 e Grupo AdEx N=11

#### 4.8 O tratamento com AdEx alterou a expressão de citocinas nos animais

A partir do restante de células do baço, foram feitas qRT-PCR com os genes já citados. Dentre os iniciadores listados na Tabela 3, apenas Arginase,  $\beta$ -actina, IL-10, IL-12, IL-21, IFN- $\gamma$ , Rentla e TGF- $\beta$  apresentaram amplificação nas condições estabelecidas. E apenas os resultados dos genes  $\beta$ -actina, Arginase, IL10 e Rentla foram passíveis de análise pelo método  $R = 2^{-[\Delta CT_{\text{alvo}} - \Delta CT_{\text{constitutivo}}]}$ , e apresentaram valores de p estatisticamente significativo (Figura 17).

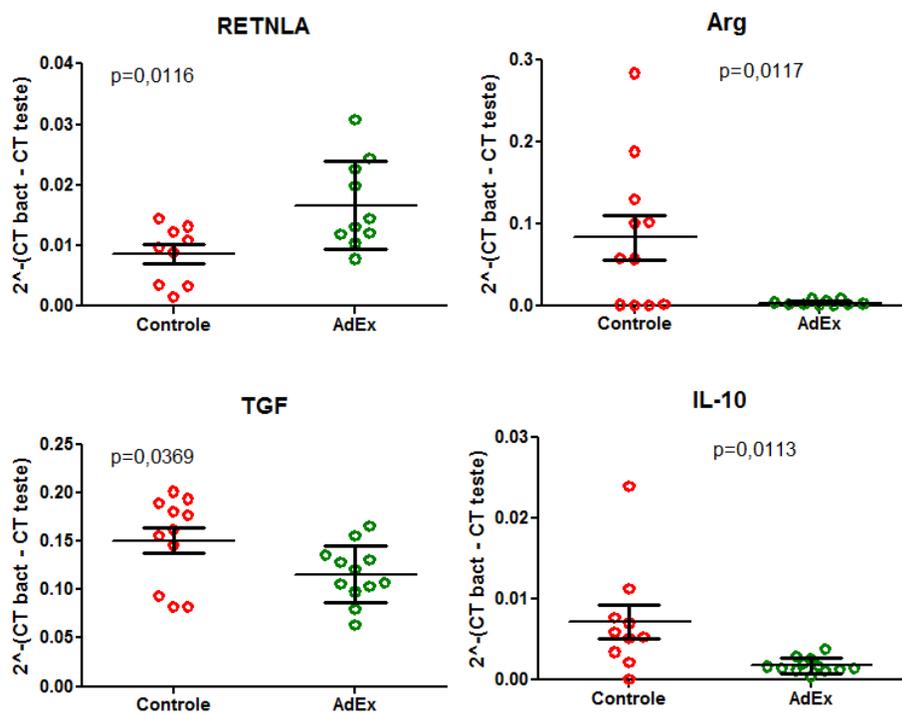


Figura 17: Comparação das amplificações dos genes de ácido retinóico (Retnla), Arginase (Arg), TGF- $\beta$  e IL-10 após 18 semanas de tratamento em esplenócitos.

## 5 DISCUSSÃO

Através deste estudo avaliou-se alguns parâmetros da resposta imunológica de camundongos com diabetes autoimune frente ao tratamento com extrato bruto de *N. americanus*. Com a metodologia descrita, visou-se investigar o potencial terapêutico da administração de produtos helmínticos na prevenção de DM1, em modelo experimental NOD.

Para a avaliação das lâminas de esfregaço sanguíneo, foram utilizadas contagens diferenciais relativa (conta-se 100 células) e absoluta (20 campos). A contagem relativa dos leucócitos pode não ser a melhor forma para relatar a realidade apresentada, visto que um aumento nos números de determinados tipos celulares não necessariamente implica na diminuição de outros tipos. No entanto, essa técnica é interessante para comparar os comportamentos celulares entre os grupos. Em contrapartida, a contagem absoluta de leucócitos descreve melhor a realidade das populações celulares. Isso se deve ao fato de não haver limitação no total de células contadas, mas sim na quantidade de campos contados. Logo, o aumento ou diminuição de um tipo celular pode ser percebido e caracterizado.

Foi observado um aumento nos números de linfócitos relativos entre as semanas 6-10 nos animais do grupo Controle, o que pode estar associado à progressão da inflamação e à proliferação de células T. Somado a isso, ainda deve ser levado em consideração a idade dos animais (12-16 semanas), onde há progressão de insulite como demonstrado por outros autores (Fernandes *et al.*, 2005). Teliëps e colegas (2016), em seus estudos com subpopulações de leucócitos em sangue periférico, demonstraram que camundongos NOD exibiam alterações nas populações de leucócitos quando comparados à camundongos resistentes a diabetes (NOR), com maiores números de linfócitos, células B e NK (Teliëps *et al.*, 2016). No entanto, essas alterações marcantes não explicavam as variações no desenvolvimento de diabetes nos animais NOD, bem como não forneceram marcadores que predissessem o diabetes nesse modelo (Teliëps *et al.*, 2016).

Ambas as contagens de leucócitos dos grupos AdEX e Controle, neste presente estudo, mostraram diferenças significativas entre as populações de eosinófilos, que exibiram quantidades aumentadas nos animais tratados com antígenos de *N. americanus*. Os

eosinófilos são células importantes no combate às infecções por helmintos, sendo ainda capazes contribuir na indução de uma resposta Th2, executando também funções efetoras (Spencer e Weller, 2010; Akuthota *et al.*, 2011; Motran *et al.*, 2018) por três mecanismos descritos: sendo fonte de interleucinas, principalmente IL-4 e IL-13, típicas de imunidade Th2; processando e apresentando antígenos para células T CD4+, promovendo diferenciação para Th2 e proliferação clonal dessas células; e, recrutando células Th2 efetoras para tecidos inflamados através da liberação de quimiocinas específicas (Spencer e Weller, 2010). Estudos com fracionamento subcelular demonstraram que os eosinófilos armazenam citocinas e quimiocinas, como IL-4, IL-5, IL-13, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, CCL11 e CCL5, em grânulos intracelulares para serem liberadas rapidamente, indicando o papel imunomodulador deste tipo celular (Neves e Weller, 2009; Spencer *et al.*, 2009; Motran *et al.*, 2018).

Além disso, a polarização para uma resposta, preferencialmente, Th2 pelos eosinófilos pode ocorrer pela liberação de mediador derivado de eosinófilos, potencialmente indutor de Th2 em outros tipos celulares, denominado indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que promove apoptose em células T, preferencialmente Th1. Há também a presença de neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), outro fator imunomodulador ativador de células dentríticas, que induz à resposta Th2 por mecanismos dependentes de TLR2 (Spencer e Weller, 2010).

As demais células analisadas, monócitos e neutrófilos, não apresentaram discrepâncias significativas (dados não mostrados), tal fato pode estar associado com a não participação ativa de neutrófilos e monócitos na inflamação autoimune dos camundongos NOD (Balda e Pacheco-Silva, 1999) ou, apesar do número ter permanecido semelhante entre os grupos, ainda faz-se necessários maiores estudos para entender se há uma diferença nas subpopulações dessas células.

Apesar da não-significância apontada no teste estatístico da curva glicêmica, pela observação do *heatmap* de glicemia podemos perceber no quadro do grupo tratado com antígenos de *N. americanus*, valores relativamente mais conformes aos níveis observados na semana zero. Esta constância entre os níveis é percebida pela presença da coloração verde mais predominante no grupo AdEX, enquanto a cor vermelha é indicativo de progressão nos níveis de glicose, e é mais observada no grupo controle. Com base nessas

observações podemos inferir que o tratamento pode ter sido funcional para os indivíduos tratados, entretanto ao analisarmos a população como um todo, a efetividade do tratamento pode ter sido mascarada.

Ademais, o extrato de *N. americanus* utilizado no experimento foi um extrato bruto, contendo proteínas de tecidos diversos que podem ou não estar em contato com o hospedeiro em caso de infecção, ou ainda induzir uma resposta diferente da Th2 proeminente nas infecções por helmintos. Com isso, proteínas potencialmente melhores indutoras de imunidade Th2, que amenizam a inflamação na diabetes, podem ter tido seus efeitos suprimidos, ou não maximamente expressos, devido aos efeitos das outras proteínas presentes.

Além disso, os índices de penetrância de DM1 nos camundongos NOD não foram altos quanto o esperado (Aoki, 2005), visto que a maioria animais, tanto do grupo tratado com antígenos como do grupo controle, não apresentaram taxas de glicemia características do quadro de DM1. A baixa penetrância observada em neste experimento pode ser explicada por: alguma(s) condição (ões) inadequada (s) no biotério e/ou na manipulação dos animais, ou até mesmo devido às características genéticas da estirpe desses camundongos NOD. Outra explicação pode ser encontrada na não continuidade do estudo até que a hiperglicemia estivesse mais bem estabelecida. No estudo de Kaminitz e colaboradores (2014), sua colônia de fêmeas NOD começaram a apresentar hiperglicemia a partir da 14ª semana, atingindo 83% de penetrância na colônia apenas na 30ª semana do estudo (Kaminitz *et al.*, 2014). Com os dados deste trabalho, nota-se que os níveis de glicose dos animais do grupo Controle começaram a aumentar a partir da 11ª semana. Enquanto os animais AdEx exibiam níveis de glicemia mais próximos à faixa de normalidade. A minoria dos animais que apresentaram taxas de glicemia altas, até 600 miligramas de glicose por decilitro de sangue (limite máximo de detecção do aparelho), morreram no decorrer das semanas de experimento. Logo, podemos inferir que a heterogeneidade no perfil de diabetes da nossa colônia pode não ter refletido adequadamente o real efeito do nosso tratamento.

Os dados da citometria de fluxo, em cultura de esplenócitos, revelaram que nos animais tratados com extrato bruto de *N. americanus* houve maiores números de células CD4+ e CD8+ produzindo interleucinas 4 e 10, e maiores números de CD4+CD25+ e macrófagos

produzindo interleucina 10. Tais resultados são coerentes com o que é encontrado na literatura, visto que é sabido que epítomos de helmintos são capazes de estimular células Treg e outras células imunológicas a proliferarem-se, além se serem fortes indutores de produção de IL-4, e também IL-10; potencialmente podendo amenizar o quadro de inflamação (Cooke, 2009b; Gaze *et al.*, 2012; Webb e Tait Wojno, 2017). Além disso, maiores taxas de IL-4 e IL-10 estão associadas a uma polarização para imunidade perfil Th2 (De Oliveira *et al.*, 2011), supondo-se haver uma menor inflamação, e consequentemente, valores de glicemia mais próximos dos normais, como observados em animais AdEX.

Na literatura, encontram-se descritos vários subtipos de linfócitos T, dentre eles os linfócitos T CD8<sup>+</sup> produtores de IL-10, induzidos por IL-4 juntamente com IL-12, também denominados Treg CD8<sup>+</sup>, que demonstraram suprimir a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> efectoras (Noble *et al.*, 2006). Em seu estudo, Zhao e colegas, demonstram que as células T CD8<sup>+</sup> naïves só se diferenciaram em produtoras de IL-10, na presença de IL-2 (sobrevivência e crescimento), e IL-4 (crítica na indução de produção de IL-10) (Zhao *et al.*, 2013). Pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação das Treg CD8<sup>+</sup>, mas especula-se que elas podem ser úteis na supressão de outras células imunológicas, e consequentemente, no controle da inflamação (Kishi *et al.*, 2010).

Apesar desses achados, não houve diferença estatística nos dados de glicemia entre os animais tratados ou não com extrato neste trabalho. Kaminitz e colaboradores, em seu estudo com células Treg em camundongos NOD, constataram que apesar de ocorrer um aumento de células Treg efectoras proporcionalmente à progressão do infiltrado inflamatório, elas não foram capazes de impedir o aumento nos níveis de glicose dos animais (Kaminitz *et al.*, 2014). Estudos anteriores já haviam demonstrado que organismos com autoimunidade, apresentam, *a priori*, uma descompensação na função de Treg (Askenasy, 2016). Kaminitz, em outro estudo, mostrou que uma interrupção da atividade diabotogênica em NOD apenas foi possível quando as células Treg CD25<sup>+</sup> tiveram sua capacidade “assassina” aumentada pela superexpressão de Fas-L (Kaminitz *et al.*, 2011).

A liberação de IL-10 por células CD4<sup>+</sup>, como visto nos camundongos tratados com extrato bruto, pode ser componente de um mecanismo de modulação de células T pelas Treg, que limita sua capacidade de expansão sem, no entanto, induzir sua apoptose. A IL-

10, juntamente com TGF- $\beta$ , é capaz também de aumentar o desenvolvimento das próprias Tregs supressivas (Kaminitz *et al.*, 2011). A produção de IL-10 por células T CD4<sup>+</sup> também tem efeito de suprimir a produção de óxido nítrico, que são altamente tóxicas para as células  $\beta$  pancreáticas (Webb e Tait Wojno, 2017).

Também foi visto maiores quantidades de macrófagos produtores de IL-10. Esse dado sugere uma ativação alternativa desses macrófagos, típica de perfil Th2 induzida por helmintos, e capaz de regular negativamente citocinas pró-inflamatórias. (Espinoza-Jiménez *et al.*, 2017). Os macrófagos alternativamente ativados expressam arginase-1, o que induz uma mudança no metabolismo da arginina para a produção de L-ornitina, um precursor de poliaminas e de colágeno, moléculas importantes na cura de feridas. Ao contrário, macrófagos clássicos convertem a arginina em óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, característicos causadores de lesão em células  $\beta$  (Reyes e Terrazas, 2007). Este dado de citometria vai de encontro ao observado nas dosagens de óxido nítrico, tanto no plasma como no sobrenadante de esplenócitos, cujos valores estavam diminuídos nos animais tratados (AdEX). Confirmando uma mudança no perfil dos macrófagos após o tratamento com extrato bruto de *N. americanus*.

Os resultados das PCRs em tempo real, em células de baço, mostraram reduções na expressão de Arginase, TGF- $\beta$  e IL-10; e aumento na expressão de Rentla nos animais do grupo AdEx. O aumento na expressão de Rentla está fortemente relacionado a respostas Th2, em diversas infecções por helmintos, e deduz-se ter papel na regulação da mesma, de forma a amenizar seus efeitos, principalmente, na formação de fibrose (Nair *et al.*, 2005; Pesce *et al.*, 2009). A molécula Rentla é tida com biomarcador de macrófagos alternativamente ativados, e eosinófilos associados aos mesmos. Em seu estudo, Nair e colaboradores mostraram que Rentla também é expresso em APCs derivadas sob condições Th2 e que sua expressão é dependente de IL-4 e IL-13 (Pesce *et al.*, 2009).

A arginase é uma enzima participante do metabolismo de L-arginina, que a converte em ornitinas, poliaminas e úreia. De antemão, a enzima NO-sintase converte o mesmo substrato em óxido nítrico, caracterizado pela toxicidade e indução de apoptose. Estudos com camundongos com DM1 mostraram uma ligação direta de aumentos de arginase com disfunções do endotélio vascular (Toque *et al.*, 2013; Pernow *et al.*, 2015). Luiz e colegas,

em seu estudo, inibiram a enzima arginase em animais NOD e perceberam que nesses animais, a incidência de diabetes estava diminuída (Hernandez *et al.*, 2018).

Muitas são as evidências dos efeitos anti-inflamatórios do TGF- $\beta$  na DM1, atuando tanto na imunossupressão local como sistêmica. Camundongos NOD que produzem TGF- $\beta$ , nas ilhotas, exibem menores infiltrados inflamatórios e menores taxas na glicemia (King *et al.*, 1998). Singh e colaboradores (2018), demonstraram em seu trabalho que a apresentação de autoantígenos, via MHC induzem inicialmente a secreção de TGF- $\beta$ , na tentativa de impedir a progressão da doença. A proliferação de células Tr1, produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$ , *in locu*, está associada à prevenção da DM1 em animais NOD (Singh *et al.*, 2018).

No entanto, estudos clínicos apontaram que há produção consideravelmente aumentada de TGF- $\beta$  no soro de pacientes com DM1, sugerindo uma resposta à ativação imunoinflamatória, no início da diabetes (Flores *et al.*, 2004), ou mesmo à estimulação por maiores níveis de glicose por células mononucleares periféricas (Reinhold *et al.*, 1996). Ao observar altos níveis de TGF- $\beta$  em pacientes diabéticos, Kretowski e colaboradores (2000) associaram tal aumento com piores controles metabólicos, visto as complicações vasculares vistas na diabetes, e relacionando a capacidade de estimulação de colágeno IV, fibronectina e proteoglicanos pelo TGF- $\beta$  (Kretowski *et al.*, 2000).

Ainda sim, no grupo controle, foram encontradas apenas aumento do mRNA dessas citocinas, e sua presença não foi detectada em nenhum dos demais experimentos. Supõe-se que talvez a tradução dessas proteínas não tenha ocorrido de maneira adequada, ou que no momento da dosagem das mesmas elas não puderam, por algum motivo, ser detectadas.

Outro parâmetro de investigação adotado foi a correlação entre os níveis de glicose e citocinas produzidas. As correlações entre glicemia e citocinas foram realizadas com base nos valores de glicemia mensurados no dia da eutanásia dos animais (semana 17), e comparados com a produção das citocinas pelos esplenócitos.

Ao analisarmos os resultados da correlação Glicemia VS Citocinas na semana 17, podemos observar menores valores de glicemia quando presentes maiores taxas de IL-4 e/ou IL-10, produzidas por linfócitos T CD4+, T CD8+ e macrófagos. Esses resultados corroboram a hipótese que antígenos de helmintos têm, potencialmente, o poder de imunomodulação e modificação da resposta imune, mesmo que no nosso experimento isso tenha apresentado-se de forma sutil. Vários estudos com infecções ou administração de

antígenos de *Schistosoma mansoni*, *Taenia crassiceps*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Trichinella spiralis* ou *Strongyloides venezuelensis* demonstraram prevenir ou inibir a DM1, em modelo NOD (Ajendra *et al.*, 2016), apenas quando iniciado antes do início da insulite (aproximadamente 4 semanas de idade) (Berbudi *et al.*, 2016).

Na dosagem de citocinas do plasma dos camundongos, observamos aumentos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  nos animais do grupo AdEx, quando comparados ao grupo tratado com PBS. É sabido que expressão e secreção de seletas citocinas por linfócitos CD4+, CD8+ e macrófagos são responsáveis pela patogênese da DM1. No entanto, os papéis de cada citocinas e suas interações na DM1 ainda não são bem elucidados e, em um panorama integrado do contexto imunológico, tornam-se complexos e até contraditórios, pois podem variar conforme os delineamentos experimentais.

A IL-10 é uma citocina multifuncional, produzida por vários tipos celulares incluindo células Th2, macrófagos ativados e células dendríticas, e está associada à regulação da inflamação, principalmente por sua ação supressora e regulatória de Tregs (Zhao *et al.*, 2013). No entanto seu papel na DM1 parece pouco esclarecido. Estudos com estimulação de IL-10 por adenovírus mostraram que aumentos de IL-10 acompanharam níveis mais altos de insulina e peptídeo C, bem como de IL-4 e diminuição de IFN- $\gamma$ . Ainda assim, animais com maiores taxas de IL-10 tiveram insulite, taxas de glicemia e apoptose de células  $\beta$  semelhante aos outros grupos, o nos leva a acreditar que a IL-10 por se não consegue reestabelecer o equilíbrio Th1/Th2 (Li *et al.*, 2016). Zacccone e colegas (2010) demonstraram que células Th1 podem expressar, concomitantemente, IFN- $\gamma$  e IL-10. E eles propuseram que essas células podem ser uma classe autorreguladora (Zacccone *et al.*, 2010). Experimentos com modelo murino sugeriram que a exposição precoce à IL-10, bem como uma super expressão da mesma nas ilhotas pancreáticas, relacionava-se com a aceleração da patogênese. Outros autores sugerem que pode estar relacionada a uma tentativa do sistema imunológico em contrabalancear um perfil pró-inflamatório, com elevados níveis de IL-12. Em neonatos humanos, níveis mais altos de IL-10 e IL-12 foram positivamente associados a risco tardio de DM1. (Thorsen *et al.*, 2017).

As interleucinas IL-4 e IL-13 são classificadas como citocinas anti-inflamatórias, capazes de modular a autoimunidade (Ukah *et al.*, 2017). A fim de se investigar seus mecanismos na DM1, Ukah e coautores (2017), delinearam um estudo com camundongos

NOD deficientes para o heteroreceptor (HR) de IL-4 e IL-13, e demonstraram que tais animais exibiam um atraso significativo no início da doença, com menos infiltração inflamatória nas ilhotas. Nos animais HR<sup>-/-</sup>, havia também uma frequência menor de células Th1, no baço, mas maior no pâncreas, quando comparados aos animais selvagens para o receptor. Os autores interpretaram os achados sugerindo que o HR relaciona-se com a produção de IL-12 por células dendríticas e, também com a expressão de receptores de IL-12 em células T naïves, logo uma deficiência no HR poderia interferir na geração de células Th1 no sítio da inflamação (Ukah *et al.*, 2017).

A IL-6 é uma citocina complexa, que parece atuar tanto na progressão quanto na proteção à autoimunidade. Em seu estudo, Yaacob e demais autores (2004) sugeriram que expressão de IL-6 em camundongos NOD teria ação de iniciar a insulite destrutiva, mas camundongos com maiores expressões de IL-6 desenvolviam a insulite mais lentamente. Logo, a proteção da IL-6 no desenvolvimento da DM1 pode ser devido à indução de produção de IL-4 por linfócitos CD4<sup>+</sup>, como foi sugerido por Rincon *et al.* (Rincón *et al.*, 1997; Yaacob *et al.*, 2004).

Por sua vez, IL-2, fator de crescimento de células T, em vários ensaios clínicos tem sido associada à alguma melhora da inflamação e na autoimunidade, devido à ativação e expansão seletiva de Tregs (Klatzmann e Abbas, 2015). Além disso, a IL-2 em linfócitos inatos residentes de tecido, que expressam constitutivamente CD25, pode estimular a eosinofilia que, por sua vez, tem várias ações imunomoduladoras (Van Gool *et al.*, 2014).

O IFN- $\gamma$  está diretamente associado ao avanço da insulite no camundongo NOD, e ao desenvolvimento de DM1 por ativação de células citotóxicas, aumento de Fas e aumento de expressão de HLA classe I. A síntese de IFN- $\gamma$ , estimulada pela IL-12, está associada à uma proteção a DM1 nos estágios iniciais, e parece torna-se prejudicial no decorrer do desenvolvimento da doença (Yaacob *et al.*, 2004). Trembleau e colegas (2003) demonstraram em seu estudo com camundongos NOD deficientes em IFN- $\gamma$  que a administração de IL-12 acelerava a DM1, exibindo uma insulite agressiva e composta majoritariamente por células APCs e células T. Em camundongos eficientes para IFN- $\gamma$ , a IL-12 exógena aumentou os níveis de IFN- $\gamma$ , o que favorece a migração de células T e aumenta a produção de óxido nítrico (NO) (Trembleau *et al.*, 2003). Essa citocina, logo, demonstrou ser complementar ao IFN- $\gamma$ , na polarização para Th1, em total ausência de IL-

4 (Trembleau *et al.*, 2003). No entanto, tal efeito não parece ser tão óbvio, visto que no mesmo estudo IL-12 demonstrou induzir uma disfunção das células APCs e uma redução na ativação de células T nos linfonodos, mostrando que os mecanismos de atuação do IFN- $\gamma$  e da IL-12 agem por vias alternativas, mas que culminam na progressão da inflamação pancreática (Trembleau *et al.*, 2003).

Annes e colaboradores (2014) realizaram uma investigação da expressão de citocinas *in locu*, da inflamação de animais com DM1, e descobriram que, nos camundongos NOD, tanto as células  $\beta$ , quanto as células de infiltrado inflamatório secretavam IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e em menor expressão, IL-2, IL-6 e IL-17A como ativadores do processo inflamatório. Ao mesmo tempo, as células do infiltrado inflamatório (T CD4+, T CD8+ e macrófagos) também expressavam IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$ 1, que aparentemente não foram capazes de neutralizar o efeito negativo das demais citocinas sobre as células  $\beta$  (Jörns *et al.*, 2014). No mesmo estudo os autores compararam os perfis de expressão em diferentes modelos de DM1, e pacientes diabéticos, e descreveram que no camundongo NOD, as citocinas pró-inflamatórias mais importantes para desencadear a destruição das células  $\beta$  são a IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Jörns *et al.*, 2014).

Estudos clínicos com crianças com DM1 (RNA positivas para enterovírus) mostraram altos níveis de IL-4, IL-6 e IL-13, quando comparadas a crianças controle, que estimulavam a produção de IFN-  $\gamma$  (Rosa *et al.*, 2008). Os níveis dessas citocinas permaneciam aumentados mesmo após a 2h de euglicemia. Apesar de altos níveis de IFN-  $\gamma$ , não houve diminuição de IL-10. Nessas mesmas crianças, foram constatados também maiores níveis de IL-12 e IL-17, relatadas por ativar células NK, que por sua vez seriam as primeiras responsáveis pela lise de células  $\beta$  (Abdel-Latif *et al.*, 2017). Em outro estudo, Jaime e demais pesquisadores, também encontraram aumentos de IL-4, IL-6 e IL-1 $\alpha$ , sustentados por até 2h após a hiperglicemia ser controlada (Rosa *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram um efeito protetor para DM1 oriundo da expansão de células Th2, secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13. (Suarez-Pinzon e Rabinovitch, 2001). Dados de pesquisas com humanos e modelo murino mostraram que IL-10 (e também outras citocinas “anti-inflamatórias” como IL-1, IL-13 e TGF-  $\beta$ ) pode ser notada no infiltrado inflamatório. No entanto os autores sugeriram que o nível de expressão pode não ter sido suficiente para amenizar a destruição causada pela inflamação (Jörns *et al.*, 2014). A investigação por

citocinas, no trabalho de Sarikonda e colaboradores (2014), vai de encontro a essa afirmação, apontando que pacientes com DM1 apresentaram níveis significativos de IL-10, não encontrado no grupo sadio, ou mesmo no grupo com DM2 (Sarikonda *et al.*, 2014).

Evidências sugerem que células Th2 secretoras de IL-4 podem regular, negativamente, a resposta Th1 e amenizar o quadro de DM1 (Delovitch e Singh, 1997; Aoki *et al.*, 2005; Askenasy, 2016). No entanto, o trabalho conduzido por Katz e colegas (1995) demonstraram que, de fato, as células Th1 promovem ativamente o diabetes, mas as células Th2 apesar de invadirem as ilhotas, não provocaram a doença - nem forneceram proteção substancial (Katz *et al.*, 1995).

Reunindo os dados da dosagem de citocinas no soro com a avaliação do infiltrado inflamatório no pâncreas, podemos inferir que o tratamento com *N. americanus* parece ter atrasado a destruição maciça das células  $\beta$  pancreáticas. Os animais AdEx, além de apresentarem ilhotas maiores (dados não mostrados), também apresentaram um maior número de ilhotas ainda sem a presença de infiltrado inflamatório circundando-as, quando comparado aos animais do grupo Controle. Nos animais do grupo Controle, ao contrário, foram encontradas além de ilhotas menores e em menor número, e muito mais ilhotas já comprometidas com insulite severa.

O efeito do tratamento, mesmo com a produção de citocinas pró-inflamatórias persistente, parece ter desacelerado a progressão da insulite, com a ajuda das citocinas anti-inflamatórias vista apenas nos animais AdEx.

Os dados encontrados na literatura relatam que a hiperglicemia nos animais, ou mesmo em humanos, só é vista quando pelo menos 80% das ilhotas já tiverem sido destruídas (Atkinson, 2014), logo os dados de glicemia são coerentes com os achados histológicos, visto que nos animais Controle as taxas de insulite ainda não eram suficientes para induzir quadros hiperglicêmicos. Nos animais AdEx, além de maiores números de ilhotas não afetadas pelo ataque do sistema imunológico, os animais apresentaram níveis de glicemia mais próximos aos níveis normais, sugerindo papéis atuantes do tratamento com extrato bruto de *N.americanus*.

## 5.1 Considerações Finais

Este estudo trouxe algumas considerações adicionais sobre os efeitos da administração de produtos de helminto na DM1, em modelo experimental. No entanto, um acompanhamento mais longo do modelo experimental, bem como um escalonamento do extrato de *Necator americanus*, seria imprescindível para uma melhor visualização do efeito do tratamento proposto.

Outras formas de mensurar o quadro de DM1 podem ajudar a melhor comparar as influências do tratamento. Estudos futuros focando na estratificação e discriminação das proteínas do extrato bruto de *N. americanus*, a fim de se eleger proteínas melhores imunomoduladoras, são recomendados. Uma vez que a utilização de proteínas imunomoduladoras provenientes de helmintos, como *N. americanus*, para terapia de DM1 ou como medida profilática para indivíduos susceptíveis pode ser muito promissora.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados corroboram a hipótese de que a exposição a produtos de helmintos pode alterar a resposta imunológica, induzindo a produção de citocinas potencialmente moduladoras e anti-inflamatórias.

Neste experimento, a administração de extrato bruto de *N. americanus* em animais diabéticos não-obesos demonstrou ser capaz de aumentar o número de linfócitos T CD4+, CD8+, CD4+CD25+ e macrófagos produtores de IL-4 e/ou IL-10, importantes citocinas Th2. Pelo ensaio de CBA também observou-se o aumento de citocinas Th2 nos animais tratados com extrato bruto, dentre elas IL-4, IL-6 e IL-10. Além disso, o tratamento também diminuiu a produção de óxido nítrico, produto altamente lesivo para células  $\beta$ . Esses dados integrados parecem ter contribuído para desacelerar a destruição das células  $\beta$  pelo infiltrado inflamatório no pâncreas (Figura 18):

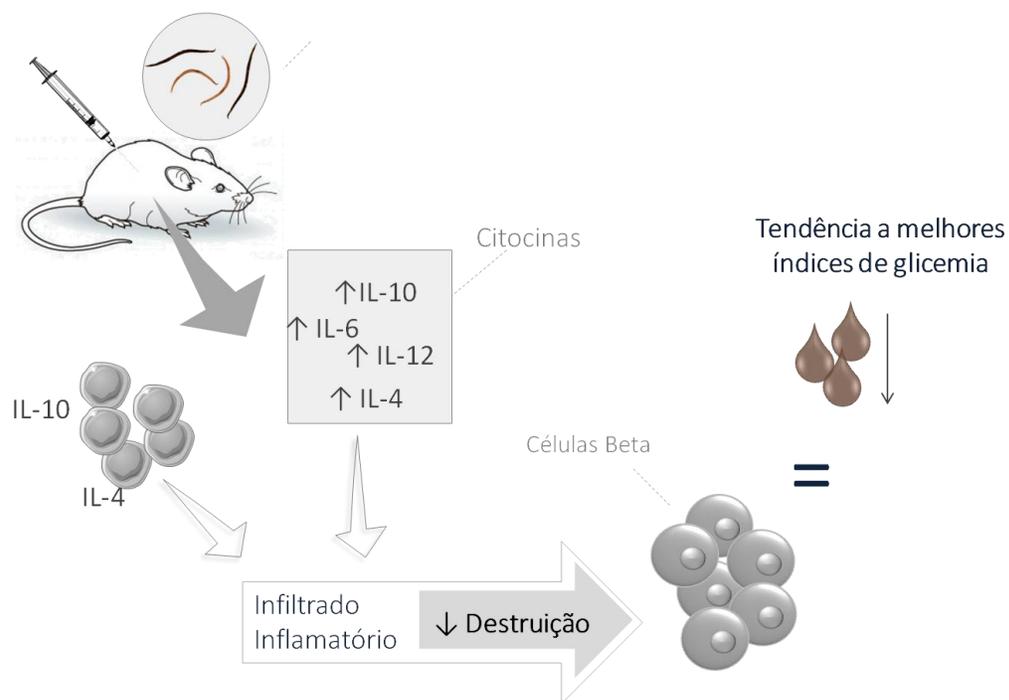


Figura 18: **Resumo dos principais resultados obtidos nos animais tratados com extrato bruto de *N. americanus*.**

Conclui-se que o tratamento é possivelmente promissor para amenizar o quadro de DM1. Mesmo tomando em consideração as limitações encontradas no delineamento deste estudo, o tratamento com extrato de *Necator americanus* demonstrou-se capaz de retardar a destruição das células  $\beta$ , no entanto não conseguiu extinguir a inflamação característica da autoimunidade vista na DM1. Mais estudos fazem-se necessários para avaliar o papel de eosinófilos, ativados pelos antígenos de *N. americanus*, na modulação da resposta imunológica; bem como melhor caracterizar as subpopulações de possíveis Tregs estimuladas pelo tratamento com extrato bruto do helminto.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-LATIF, M. *et al.* Comparative and correlative assessments of cytokine, complement and antibody patterns in paediatric type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol**, v. 190, n. 1, p. 110-121, Oct 2017. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28640379> >.

AJENDRA, J. *et al.* Combination of worm antigen and proinsulin prevents type 1 diabetes in NOD mice after the onset of insulinitis. **Clin Immunol**, v. 164, p. 119-122, Feb 2016. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26898311> >.

AKUTHOTA, P.; XENAKIS, J. J.; WELLER, P. F. Eosinophils: offenders or general bystanders in allergic airway disease and pulmonary immunity? **J Innate Immun**, v. 3, n. 2, p. 113-9, 2011. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21228563> >.

ALAM, U. *et al.* General aspects of diabetes mellitus. **Handb Clin Neurol**, v. 126, p. 211-22, 2014. ISSN 0072-9752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410224> >.

AOKI, C. A. *et al.* NOD mice and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 6, p. 373-9, Jul 2005. ISSN 1568-9972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081028> >.

ASKENASY, E. M.; ASKENASY, N. Is autoimmune diabetes caused by aberrant immune activity or defective suppression of physiological self-reactivity? **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 5, p. 633-7, Mar 2013. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277162> >.

ASKENASY, N. Mechanisms of diabetic autoimmunity: II-Is diabetes a central or peripheral disorder of effector and regulatory cells? **Immunol Res**, Oct 2015. ISSN 1559-0755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482052> >.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of autoimmunity in the NOD mouse: effector/regulatory cell equilibrium during peak inflammation. **Immunology**, Jan 2016. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26749404> >.

ASSOCIATION, A. D. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 35 Suppl 1, p. S64-71, Jan 2012. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187472> >.

\_\_\_\_\_. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 37 Suppl 1, p. S81-90, Jan 2014. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357215> >.

ATKINSON, M. A. Losing a grip on the notion of  $\beta$ -cell specificity for immune responses in type 1 diabetes: can we handle the truth? **Diabetes**, v. 63, n. 11, p. 3572-4, Nov 2014. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342726> >.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221-9, Jul 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476858> >.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69-82, Jan 2014. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890997> >.

BACH, J. F. Autoimmunity and type I diabetes. **Trends Endocrinol Metab**, v. 8, n. 2, p. 71-4, Mar 1997. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406789> >.

\_\_\_\_\_. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med**, v. 347, n. 12, p. 911-20, Sep 2002. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239261> >.

\_\_\_\_\_. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. **Nat Rev Immunol**, v. 18, n. 2, p. 105-120, Feb 2018. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29034905> >.

BACH, J. F.; CHATENOU, L. The hygiene hypothesis: an explanation for the increased frequency of insulin-dependent diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 2, p. a007799, Feb 2012. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355800> >.

BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. [Immunologic aspects of type 1 diabetes *mellitus*]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 45, n. 2, p. 175-80, 1999 Apr-Jun 1999. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413923> >.

BERBUDI, A. *et al.* Parasitic helminths and their beneficial impact on type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 32, n. 3, p. 238-50, Mar 2016. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119261> >.

BOITARD, C. Pancreatic islet autoimmunity. **Presse Med**, v. 41, n. 12 P 2, p. e636-50, Dec 2012. ISSN 2213-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23182678> >.

BREZAR, V. *et al.* Beyond the hormone: insulin as an autoimmune target in type 1 diabetes. **Endocr Rev**, v. 32, n. 5, p. 623-69, Oct 2011. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700723> >.

BRIGGS, N. *et al.* The Hygiene Hypothesis and Its Inconvenient Truths about Helminth Infections. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 9, p. e0004944, Sep 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27632204> >.

BUSCHARD, K. What causes type 1 diabetes? Lessons from animal models. **APMIS Suppl**, n. 132, p. 1-19, Jul 2011. ISSN 1600-5503. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615797> >.

CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes *mellitus*. **Autoimmun Rev**, v. 13, n. 4-5, p. 403-7, 2014 Apr-May 2014. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424179> >.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, Hookworm. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/hookworm/biology.html> >. Acesso em 24 de abril de 2018.

CHEN, Y. G.; MATHEWS, C. E.; DRIVER, J. P. The Role of NOD Mice in Type 1 Diabetes Research: Lessons from the Past and Recommendations for the Future. **Front Endocrinol**

(Lausanne), v. 9, p. 51, 2018. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29527189> >.

CLARK, M.; KROGER, C. J.; TISCH, R. M. Type 1 Diabetes: A Chronic Anti-Self-Inflammatory Response. **Front Immunol**, v. 8, p. 1898, 2017. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29312356> >.

COOKE, A. Infection and autoimmunity. **Blood Cells Mol Dis**, v. 42, n. 2, p. 105-7, 2009 Mar-Apr 2009a. ISSN 1096-0961. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027331> >.

\_\_\_\_\_. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 12-7, Jan 2009b. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120494> >.

COPPIETERS, K. T.; HARRISON, L. C.; VON HERRATH, M. G. Trials in type 1 diabetes: Antigen-specific therapies. **Clin Immunol**, v. 149, n. 3, p. 345-55, Dec 2013. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23490422> >.

COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Histopathology of type 1 diabetes: old paradigms and new insights. **Rev Diabet Stud**, v. 6, n. 2, p. 85-96, 2009. ISSN 1614-0575. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19806238> >.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847-58, Mar 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530579> >.

DE GROOT, M. *et al.* Depression Among Adults With Diabetes: Prevalence, Impact, and Treatment Options. **Diabetes Spectr**, v. 23, n. 1, p. 15-18, Jan 2010. ISSN 1040-9165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22485068> >.

DEJACO, C. *et al.* Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. **Immunology**, v. 117, n. 3, p. 289-300, Mar 2006. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476048> >.

DELOVITCH, T. L.; SINGH, B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 727-38, Dec 1997. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430219> >.

DIEMERT, D. J.; BETHONY, J. M.; HOTEZ, P. J. Hookworm vaccines. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 2, p. 282-8, Jan 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171264> >.

EGRO, F. M. Why is type 1 diabetes increasing? **J Mol Endocrinol**, v. 51, n. 1, p. R1-13, 2013. ISSN 1479-6813. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23733895> >.

EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology. **Adv Exp Med Biol**, v. 552, p. 306-10, 2004. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15622970> >.

ESPINOZA-JIMÉNEZ, A.; DE HARO, R.; TERRAZAS, L. I. Antigens Control Experimental Type 1 Diabetes by Inducing Alternatively Activated Macrophages. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 8074329, 2017. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29249872> >.

FERNANDES, A. P. *et al.* [Immunogenetic factors associated with type 1 diabetes *mellitus*]. **Rev Lat Am Enfermagem**, v. 13, n. 5, p. 743-9, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0104-1169. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16308633> >.

FERRETTI, C.; LA CAVA, A. Adaptive immune regulation in autoimmune diabetes. **Autoimmun Rev**, v. 15, n. 3, p. 236-41, Mar 2016. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26631820> >.

FLORES, L. *et al.* Transforming growth factor  $\beta$  at clinical onset of Type 1 diabetes *mellitus*. A pilot study. **Diabet Med**, v. 21, n. 8, p. 818-22, Aug 2004. ISSN 0742-3071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15270783> >.

FUNDA, D. P. *et al.* Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 15, n. 5, p. 323-7, 1999 Sep-Oct 1999. ISSN 1520-7552. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585617> >.

GAZE, S. *et al.* Characterising the mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002520, Feb 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22346753> >.

GEENEN, V. Thymus and type 1 diabetes: an update. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 98, n. 1, p. 26-32, Oct 2012. ISSN 1872-8227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22717497> >.

GEMEAY, E. M. *et al.* The association between diabetes and depression. **Saudi Med J**, v. 36, n. 10, p. 1210-5, Oct 2015. ISSN 0379-5284. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26446333> >.

HEINONEN, M. T.; MOULDER, R.; LAHESMAA, R. New Insights and Biomarkers for Type 1 Diabetes: Review for Scandinavian Journal of Immunology. **Scand J Immunol**, v. 82, n. 3, p. 244-53, Sep 2015. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119046> >.

HERNANDEZ, L. F.; BUCHWALD, P.; ABDULREDA, M. H. Effect of Arginase-1 Inhibition on the Incidence of Autoimmune Diabetes in NOD Mice. **Curr Res Diabetes Obes J**, v. 5, n. 3, Jan 2018. ISSN 2476-1435. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29450408> >.

HOTEZ, P. J. *et al.* Hookworm infection. **N Engl J Med**, v. 351, n. 8, p. 799-807, Aug 2004. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15317893> >.

JENNINGS, R. E. *et al.* Human pancreas development. **Development**, v. 142, n. 18, p. 3126-37, Sep 2015. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26395141> >.

JÖRNS, A. *et al.* Islet infiltration, cytokine expression and  $\beta$  cell death in the NOD mouse, BB rat, Komeda rat, LEW.1AR1-iddm rat and humans with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 57, n. 3,

p. 512-21, Mar 2014. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24310561> >.

KACHAPATI, K. *et al.* The non-obese diabetic (NOD) mouse as a model of human type 1 diabetes. **Methods Mol Biol**, v. 933, p. 3-16, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22893397> >.

KAHALY, G. J.; HANSEN, M. P. Type 1 diabetes associated autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 15, n. 7, p. 644-8, Jul 2016. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903475> >.

KAMINITZ, A.; MIZRAHI, K.; ASKENASY, N. Surge in regulatory T cells does not prevent onset of hyperglycemia in NOD mice: immune profiles do not correlate with disease severity. **Autoimmunity**, v. 47, n. 2, p. 105-12, Mar 2014. ISSN 1607-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24328490> >.

KAMINITZ, A. *et al.* Killer Treg restore immune homeostasis and suppress autoimmune diabetes in prediabetic NOD mice. **J Autoimmun**, v. 37, n. 1, p. 39-47, Aug 2011. ISSN 1095-9157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497486> >.

KATSAROU, A. *et al.* Type 1 diabetes *mellitus*. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17016, Mar 2017. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28358037> >.

KATZ, J. D.; BENOIST, C.; MATHIS, D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1185-8, May 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7761837> >.

KERNER, W.; BRÜCKEL, J.; ASSOCIATION, G. D. Definition, classification and diagnosis of diabetes *mellitus*. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 122, n. 7, p. 384-6, Jul 2014. ISSN 1439-3646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014088> >.

KING, C. *et al.* Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. **Cell**, v. 117, n. 2, p. 265-77, Apr 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084263> >.

KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. **Modelos experimentais para estudo de diabetes tipo 1.** Animals models for type 1 diabetes studies. SESTERHEIM, P. Revista de Medicina de Riberão Preto. 43: 10 p. 2010.

KISHI, M. *et al.* Regulatory CD8+ T cells induced by exposure to all-trans retinoic acid and TGF- $\beta$  suppress autoimmune diabetes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, n. 1, p. 228-32, Mar 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206130> >.

KLATZMANN, D.; ABBAS, A. K. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 5, p. 283-94, May 2015. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25882245> >.

KRETOWSKI, A.; MACIEJ, K.; IDA, K. The analysis of in vitro transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) production by peripheral blood in overt and pre-clinical type 1 diabetes *mellitus*. **Immunol Lett**, v. 71, n. 2, p. 85-9, Feb 2000. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714434> >.

KOSTIC, A. D. *et al.* The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. **Cell Host Microbe**, v. 17, n. 2, p. 260-73, Feb 2015. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662751> >.

LESLIE, R. D. *et al.* Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. **Diabetologia**, Oct 2015. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26498592> >.

LI, C. *et al.* Protective role of adenovirus vector-mediated interleukin-10 gene therapy on endogenous islet  $\beta$ -cells in recent-onset type 1 diabetes in NOD mice. **Exp Ther Med**, v. 11, n. 5, p. 1625-1632, May 2016. ISSN 1792-0981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27168782> >.

MAGANTI, A.; EVANS-MOLINA, C.; MIRMIRA, R. From immunobiology to  $\beta$ -cell biology: the changing perspective on type 1 diabetes. **Islets**, v. 6, n. 2, p. e28778, 2014. ISSN 1938-2022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483958> >.

MORRAN, M. P. *et al.* Immunogenetics of type 1 diabetes *mellitus*. **Mol Aspects Med**, v. 42, p. 42-60, Apr 2015. ISSN 1872-9452. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25579746> >.

MOTRAN, C. C. *et al.* Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. **Front Immunol**, v. 9, p. 664, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670630> >.

MULLEN, Y. Development of the Nonobese Diabetic Mouse and Contribution of Animal Models for Understanding Type 1 Diabetes. **Pancreas**, v. 46, n. 4, p. 455-466, Apr 2017. ISSN 1536-4828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28291161> >.

NAIR, M. G. *et al.* Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 385-94, Jan 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618176> >.

NEVES, J. S.; WELLER, P. F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 6, p. 694-9, Dec 2009. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709867> >.

NOBLE, A.; GIORGINI, A.; LEGGAT, J. A. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4475-83, Jun 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467201> >.

NAKAYAMA, M. *et al.* Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. **Nature**, v. 435, n. 7039, p. 220-3, May 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15889095> >.

NOBLE, J. A. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. **J Autoimmun**, v. 64, p. 101-12, Nov 2015. ISSN 1095-9157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26272854> >.

PATTERSON, C. C. *et al.* Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2027-33, Jun 2009. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481249> >.

PEARSON, J. A.; WONG, F. S.; WEN, L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. **J Autoimmun**, v. 66, p. 76-88, Jan 2016. ISSN 1095-9157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403950> >.

PERNOW, J. *et al.* Tissue-specific up-regulation of arginase I and II induced by p38 MAPK mediates endothelial dysfunction in type 1 diabetes *mellitus*. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 19, p. 4684-98, Oct 2015. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140333> >.

PESCE, J. T. *et al.* Retnla (relmalpha/fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 4, p. e1000393, Apr 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19381262> >.

POCIOT, F. *et al.* Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1561-71, Jul 2010. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20587799> >.

RASSI, D. M. *et al.* Gene expression profiles stratified according to type 1 diabetes *mellitus* susceptibility regions. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1150, p. 282-9, Dec 2008. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120314> >.

REYES, J. L.; TERRAZAS, L. I. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 12, p. 609-19, Dec 2007. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042168> >.

D. REIHOLD, S. ANSORGE, E.D. SCHLEICHER. Elevated glucose levels stimulate TGF- $\beta$ 1, suppress IL-2, IL-6, and IL-10 production and DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells. **Horm. Metab. Res.**, 28 (1996), pp. 267-270.

RICHARDSON, S. J.; MORGAN, N. G.; FOULIS, A. K. Pancreatic pathology in type 1 diabetes *mellitus*. **Endocr Pathol**, v. 25, n. 1, p. 80-92, Mar 2014. ISSN 1559-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24522639> >.

RINCÓN, M. *et al.* Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. **J Exp Med**, v. 185, n. 3, p. 461-9, Feb 1997. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9053446> >.

ROEP, B. O. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**, v. 46, n. 3, p. 305-21, Mar 2003. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12687328> >.

ROSA, J. S. *et al.* Sustained IL-1 $\alpha$ , IL-4, and IL-6 elevations following correction of hyperglycemia in children with type 1 diabetes *mellitus*. **Pediatr Diabetes**, v. 9, n. 1, p. 9-16, Feb 2008. ISSN 1399-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18211631> >.

ROSMALEN, J. G. *et al.* Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 5, p. 209-14, Jul 2002. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12185667> >.

SARIKONDA, G. *et al.* Higher proinflammatory cytokine production and spontaneous activation in some type 1 and type 2 diabetic subjects. **Clin Immunol**, v. 155, n. 1, p. 27-9, Nov 2014. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25173803> >.

SHAO, S. *et al.* Th17 cells in type 1 diabetes. **Cell Immunol**, v. 280, n. 1, p. 16-21, Nov 2012. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246831> >.

SHARMA, A. *et al.* Oxidative Stress and NLRP3-Inflammasome Activity as Significant Drivers of Diabetic Cardiovascular Complications: Therapeutic Implications. **Front Physiol**, v. 9,

p. 114, 2018. ISSN 1664-042X. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29515457>>.

SILVA, M. E.; MORY, D.; DAVINI, E. [Genetic and humoral autoimmunity markers of type 1 diabetes: from theory to practice]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 2, p. 166-80, Mar 2008. ISSN 1677-9487. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438527>>.

SINGH, B. *et al.* Role of TGF- $\beta$  in Self-Peptide Regulation of Autoimmunity. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 66, n. 1, p. 11-19, Feb 2018. ISSN 1661-4917. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28733878>>.

SPENCER, L. A. *et al.* Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. **J Leukoc Biol**, v. 85, n. 1, p. 117-23, Jan 2009. ISSN 0741-5400. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840671>>.

SPENCER, L. A.; WELLER, P. F. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. **Immunol Cell Biol**, v. 88, n. 3, p. 250-6, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1440-1711. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20065995>>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. Disponível em: <  
<http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>>  
Acesso em 21 de abril de 2018.

SUAREZ-PINZON, W. L.; RABINOVITCH, A. Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits. **Int J Exp Diabetes Res**, v. 2, n. 1, p. 3-17, 2001. ISSN 1560-4284. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369724>>.

SUK, K. *et al.* IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic  $\beta$  cell death. **J Immunol**, v. 166, n. 7, p. 4481-9, Apr 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254704>>.

TAGHIPOUR, N. *et al.* Potential treatment of inflammatory bowel disease: a review of helminths therapy. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, v. 7, n. 1, p. 9-16, 2014. ISSN 2008-2258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25436093> >.

TELIEPS, T. *et al.* Longitudinal Frequencies of Blood Leukocyte Subpopulations Differ between NOD and NOR Mice but Do Not Predict Diabetes in NOD Mice. **J Diabetes Res**, v. 2016, p. 4208156, 2016. ISSN 2314-6753. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26966692> >.

THORSEN, S. U. *et al.* Neonatal levels of adiponectin, interleukin-10 and interleukin-12 are associated with the risk of developing type 1 diabetes in childhood and adolescence: A nationwide Danish case-control study. **Clin Immunol**, v. 174, p. 18-23, Jan 2017. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27871914> >.

TODD, J. A. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. **Immunol Today**, v. 11, n. 4, p. 122-9, Apr 1990. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2187469> >.

\_\_\_\_\_. Etiology of type 1 diabetes. **Immunity**, v. 32, n. 4, p. 457-67, Apr 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412756> >.

TOQUE, H. A. *et al.* Akita spontaneously type 1 diabetic mice exhibit elevated vascular arginase and impaired vascular endothelial and nitric function. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72277, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23977269> >.

TREMBLEAU, S. *et al.* IL-12 administration accelerates autoimmune diabetes in both wild-type and IFN-gamma-deficient nonobese diabetic mice, revealing pathogenic and protective effects of IL-12-induced IFN-gamma. **J Immunol**, v. 170, n. 11, p. 5491-501, Jun 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759426> >.

TRIPLITT, C. L. Examining the mechanisms of glucose regulation. **Am J Manag Care**, v. 18, n. 1 Suppl, p. S4-10, Jan 2012. ISSN 1936-2692. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22559855> >.

TRIPLITT, S. S. F.-S. P. *et al.* **Classification of Diabetes Mellitus**. SOLIS-HERRERA, C. 2015.

TUN, N. N. *et al.* Diabetes mellitus and stroke: A clinical update. **World J Diabetes**, v. 8, n. 6, p. 235-248, Jun 2017. ISSN 1948-9358. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28694925> >.

UKAH, T. K. *et al.* On the Role IL-4/IL-13 Heteroreceptor Plays in Regulation of Type 1 Diabetes. **J Immunol**, v. 199, n. 3, p. 894-902, 08 2017. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28646042> >.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev**, v. 91, n. 1, p. 79-118, Jan 2011. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248163> >.

VAN GOOL, F. *et al.* Interleukin-5-producing group 2 innate lymphoid cells control eosinophilia induced by interleukin-2 therapy. **Blood**, v. 124, n. 24, p. 3572-6, Dec 2014. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323825> >.

WAMMES, L. J. *et al.* Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. **Lancet Infect Dis**, v. 14, n. 11, p. 1150-62, Nov 2014. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24981042> >.

WANG, M. *et al.* Therapeutic potential of helminths in autoimmune diseases: helminth-derived immune-regulators and immune balance. **Parasitol Res**, v. 116, n. 8, p. 2065-2074, Aug 2017. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28664463> >.

WEN, L. *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1109-13, Oct 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806780> >.

WEBB, L. M.; TAIT WOJNO, E. D. The role of rare innate immune cells in Type 2 immune activation against parasitic helminths. **Parasitology**, v. 144, n. 10, p. 1288-1301, Sep 2017. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28583216> >.

WICKER, L. S. *et al.* Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. **J Autoimmun**, v. 25 Suppl, p. 29-33, 2005. ISSN 0896-8411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257508> >.

YAACOB, N. S.; KADERI, M. A.; NORAZMI, M. N. The expression of cytokine genes in the peritoneal macrophages and splenic CD4- and CD8-positive lymphocytes of the nonobese diabetic mice. **J Clin Immunol**, v. 24, n. 2, p. 177-84, Mar 2004. ISSN 0271-9142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15024185> >.

ZACCONE, P.; COOKE, A. Helminth mediated modulation of Type 1 diabetes (T1D). **Int J Parasitol**, v. 43, n. 3-4, p. 311-8, Mar 2013. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291464> >.

ZÓKA, A.; SOMOGYI, A.; FIRNEISZ, G. [Type 1 diabetes *mellitus*: most recent advances in its pathogenesis and treatment]. **Orv Hetil**, v. 153, n. 27, p. 1047-56, Jul 2012. ISSN 0030-6002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22759745> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Diabetes *Mellitus*. Disponível em: < [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/en/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/) > Acesso em 21 de abril de 2018.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 389 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Avaliação de parâmetros imunológicos do tratamento de camundongos diabéticos com antígenos de ancilostomídeos.”, que tem como responsável Ricardo Toshio Fujiwara, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/04/2013. Este certificado espira-se em 11/04/2018.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 389 / 2012, related to the Project entitled “Immunological evaluation of hookworm antigens treatment in diabetic mice”, under the supervision of Ricardo Toshio Fujiwara, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/04/2013. This certificate expires in 11/04/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 11/04/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG <https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)