

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Potencial profilático de estratégias tolerogênicas no
diabetes experimental**

Bianca Balbino

Orientadora: Profa. Alexandrina Sartori

Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências de
Botucatu – UNESP, como
exigência parcial para a
obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

Botucatu - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Balbino, Bianca.

Potencial profilático de estratégias tolerogênicas no diabetes experimental /
Bianca Balbino. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.

Orientador: Alexandrina Sartori

Capes: 21102007

1. Diabetes. 2. Insulina. 3. Adjuvantes imunológicos.

Palavras-chave: Adjuvante incompleto de Freund; Dexametasona; Diabetes autoimune; Estreptozotocina; Imunomodulação; Insulina.

*“Somos feitos da mesma matéria
dos nossos sonhos”*

William Shakespeare

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra e Edgar, pois são as pessoas que mais amo no mundo e sem vocês não teria chegado aonde cheguei. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todos os meus sonhos.

Aos meus irmãos, Guilherme e Gustavo, por terem compartilhado comigo todos os momentos e conquistas.

À minha avó e madrinha, Nair, por todo amor e dedicação dispensada em todos os períodos de minha vida.

Amo vocês!

Agradeço...

A Deus, por ter me permitido vivenciar todas as experiências, não só dentro da Universidade, ao lado de todos que amo.

À minha orientadora Alexandrina Sartori, por ter me permitido viver dentro de seu laboratório e ter compartilhado com sua equipe minha primeira experiência dentro da pesquisa. Por ter partilhado comigo muito de seu conhecimento e dedicação com o trabalho, me ajudando a corrigir e suprir eventuais falhas e lacunas, sempre mostrando o melhor e oferecendo oportunidades para meu crescimento profissional.

À minha companheira de projeto, Larrisa (Akú), por ter me aceitado no meio de seu mestrado, me guiado em todos os passos e empecilhos que surgiram. Pelo apoio e paciência nos mais diversos momentos que vivenciamos durante esse ano de trabalho juntas.

Às pessoas com quem compartilhei todos meus dias durante o último ano: Sofia, Thais, Fernanda, Larissa (Dutra), Larissa (Akú) e Priscila. São pessoas com quem aprendi muito. Tenho grande admiração e apreço por terem me mostrado com profissionalismo, dedicação e paciência como é trabalhar nesta profissão que escolhi. Obrigada também por terem tornado o ambiente de trabalho agradável e propício para enfrentar esse primeiro desafio, minha iniciação científica.

À Camila (Mosquete), minha irmã e anjo, por ter compartilhado comigo os melhores momentos e anos de minha vida. Aos meus amigos da XLIV, Vanessa (Istalone), Vinicius (Zulu), Janaina (Mitaka), Mariana (Hips), Natasha (Flácida), Patricia (Serosa), Felipe (Borra), que foram não só colegas dentro da sala de aula, mas também se transformaram em companheiros de todos os momentos, me fazendo sentir sempre muito querida e acolhida, transformando Botucatu em minha segunda casa.

Agradecimentos

Aos meus queridos amigos, Marília (Kktua), André (Qualy), Carla (Caldinho) e Juliana (Balsa) por terem me mostrado que uma amizade linda pode surgir nos momentos menos esperados e que a vida tem algumas surpresas inexplicáveis. Em especial à minha irmã de coração, Amanda (Para), uma pessoa maravilhosa a quem agradeço muito pelos infinitos momentos de suporte e dedicação a esta amizade. Amo vocês!

Ao Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM) e a todos que nele fizeram parte, por me trazerem o maior aprendizado, aquele que não se ensina na sala de aula, de como trabalhar em grupo em prol de um objetivo comum. Levarei comigo todo o aprendizado que tive com cada um dentro desta grande família.

Às meninas da minha república, que mais que companheiras de casa, se tornaram minha amigas. Obrigada por todos esses anos de convivência, Cíntia (Xak's), Cristiane (Fiota), Júlia (Mínkia), Patrícia (Serosa), Mariana (Losinha), Luana (Ostra) e Paula (Yodô). Sentirei muitas saudades.

Aos meus amigos Camila, Gustavo, Renan e Rodrigo, por me mostrarem que a amizade pode ser duradoura mesmo com a distância e o tempo, hoje tenho a certeza que vocês me acompanharão em todos os momentos da minha vida.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências por toda ajuda na execução das etapas deste projeto.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO	7
1. Introdução.....	8
1.1 Autoimunidade.....	8
1.2 Diabetes autoimune.....	8
1.3 Imunopatogênese	9
1.4 Modelos Experimentais	10
1.5 Estratégias profiláticas específicas	11
1.6 Racional científico deste projeto.....	12
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Imunizações com insulina e Adjuvante Incompleto de Freund.....	14
3.3 Imunização com insulina e dexametasona.....	15
3.4 Indução de diabetes com estreptozotocina.....	15
3.5 Determinação da glicemia e peso corpóreo	15
3.6 Análise histopatológica do pâncreas	15
3.7 Obtenção de sobrenadantes de culturas	16
3.8 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	16
3.8.1 Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura.....	16
3.9 Análise estatística	17
4. Protocolos experimentais e resultados.....	18
4.1 Protocolo Experimental I.....	18
4.1.1 Resultados do Protocolo Experimental I.....	19
4.2 Protocolo Experimental II.....	26
4.2.1 Resultados do Protocolo Experimental II.....	27
5. Discussão	33
6. Referências Bibliográficas.....	37

RESUMO

O diabetes mellitus tipo I (DM1) é uma doença causada pela destruição autoimune das células β do pâncreas que resulta em deficiência na produção de insulina e cujo tratamento não é totalmente eficaz. A terapia existente visa apenas controlar a progressão da patologia através da injeção diária de insulina exógena e, portanto, uma alternativa terapêutica ou profilática para a doença é necessária. O objetivo deste projeto foi avaliar o potencial profilático de duas estratégias vacinais baseadas na imunização com insulina em condições tolerogênicas que incluem associação com Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e dexametasona (dexa). Para isso, camundongos C57BL/6 machos foram imunizados com a cadeia B da insulina e posteriormente inoculados com múltiplas doses de estreptozotocina para desencadeamento do DM1. Os seguintes parâmetros foram empregados para avaliar o possível efeito protetor: níveis glicêmicos, variação de peso corporal, histopatologia do pâncreas e perfil de citocinas produzidas por células esplênicas. Os grupos experimentais previamente imunizado com insulina (insulina+AIF+STZ) e inoculado com adjuvante (AIF+STZ), mas não o grupo imunizado com insulina associada à dexametasona, apresentaram uma diminuição no percentual da insulite severa (grau 3) quando comparados com o grupo STZ. Este efeito protetor esteve associado com maior produção de IL-5 e IL-10. Estes resultados demonstram que embora uma dose de insulina associada ao AIF apresente potencial imunorregulador capaz de diminuir a gravidade da insulite, esta não foi eficaz na prevenção do desenvolvimento clínico da doença. Além disso, este efeito parece ser, em grande parte, mediado pelo próprio AIF.

Palavras-chave: Adjuvante Incompleto de Freund; Dexametasona; Diabetes autoimune; Estreptozotocina; Imunomodulação; Insulina.

1. Introdução

1.1 Autoimunidade

O sistema imunológico atua, principalmente, na eliminação de elementos estranhos ao próprio organismo e para tal, se faz necessário o reconhecimento de agentes estranhos. A discriminação entre os componentes próprios, os quais devem ser tolerados, e os componentes externos, os quais devem ser reconhecidos como perigosos e, então, eliminados, é de extrema importância para o bom funcionamento deste processo. A autoimunidade se estabelece quando há um desequilíbrio no processo de autotolerância resultando na ativação de linfócitos B e T autorreativos que desencadeiam um ataque contra o hospedeiro, determinando assim uma lesão celular e/ou tecidual.

As doenças autoimunes afetam de 3 a 5% da população em geral, sendo mais prevalentes em mulheres (O'Shea et al., 2002). A etiologia e a patogênese dessas doenças são muito estudadas, mas até o momento, só foram elucidadas parcialmente. Sabe-se que tanto fatores genéticos quanto ambientais contribuem para seu aparecimento. Algumas apresentam manifestações sistêmicas, sendo que outras podem se restringir a um único órgão ou tecido específico, como é o caso do Diabetes mellitus tipo I (Marrack et al., 2001).

1.2 Diabetes autoimune

Diabetes mellitus tipo I é uma doença causada pela destruição autoimune das células β do pâncreas que resulta em deficiência na produção de insulina. Esta deficiência afeta o metabolismo da glicose, resultando em cetoacidose, e causa complicações em vários sistemas do organismo por ação do estresse oxidativo (Maiese et al., 2010). O estágio avançado da doença é caracterizado por lesões vasculares ateroscleróticas, insuficiência renal e cegueira. O início deste processo autoimune tem sido associado com agentes infecciosos os quais determinariam expressão de moléculas de histocompatibilidade nas células β , seguida de apresentação de antígenos próprios por estas células (van der Werf et al., 2007). Diferentes tipos celulares contribuem com a insulite que caracteriza a doença e se instala antes da hiperglicemia, em especial

macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B autorreativos. Autoanticorpos parecem contribuir com a lesão das ilhotas, mas mecanismos celulares mediados por linfócitos Th1 e Tc são descritos como mais relevantes (Gianani & Eisenbarth, 2005). Entre os vários autoantígenos identificados como alvos de células T diabetogênicas destacam-se: insulina, IA-2, descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e hsp60 (Nicholas et al., 2011). A insulina é descrita como alvo da resposta imune iniciadora e por isto tem sido proposto que o bloqueio de resposta contra a insulina evitaria o *epitope spreading*, bloqueando desta forma o início da doença (Liu et al, 2007).

1.3 Imunopatogênese

Existe concordância geral na literatura de que as células T são fundamentais no processo autoimune que ocorre no diabetes. O diabetes tipo I resulta da destruição das células β produtoras de insulina por um processo autoimune específico. Autoantígenos seriam inicialmente liberados das células β por infecções virais, outros tipos de estresse local ou até mesmo pelo *turnover* celular. Estes autoantígenos seriam capturados por células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como macrófagos (M) e células dendríticas (CD) e transportados aos linfonodos regionais que drenam o pâncreas. Células T $CD4^+$ autorreativas as quais circulam no sangue e nos órgãos linfóides, incluindo os linfonodos pancreáticos, reconheceriam peptídeos próprios das células β associados com moléculas de histocompatibilidade. Este seria o início de um processo envolvendo vários tipos celulares cujo resultado final seria uma insulite destrutiva. Estas células T $CD4^+$ poderiam ser ativadas por IL-12 liberada por macrófagos e células dendríticas. Concomitantemente células T $CD8^+$ específicas para autoantígeno seriam ativadas pela IL-2 oriunda das células T $CD4^+$ ativadas e se diferenciariam em Tc efetoras. Células T $CD4^+$ também ativariam M pela liberação de IFN- γ . Estes tipos celulares migrariam para as ilhotas e destruiriam as células β . As principais substâncias envolvidas na destruição das células β seriam mediadores solúveis tais como citocinas, derivados reativos de oxigênio liberados pelos M ativados e também por granzimas e perforinas liberadas por Tc (Yoon & Jun, 2005; Roep, 2003). Recentemente a contribuição das células Th₁₇ na patogênese do diabetes autoimune tem sido confirmada (Emamaulle et al., 2009)

Como é sabido, o sistema imune dispõe de vários mecanismos capazes de controlar uma possível hiperreatividade e também processos de autodestruição

imunológica. Neste sentido, duas subpopulações celulares com funções imunorreguladoras bem conhecidas, como é o caso das células Th₂ e T reguladoras, podem estar envolvidas na regulação do diabetes autoimune. O conhecimento destas complexas interações celulares tem permitido delinear estratégias de imunointervenção tanto no sentido profilático quanto terapêutico.

1.4 Modelos Experimentais

Entre os modelos mais utilizados para o estudo de diabetes tipo 1 se destaca o *nonobese diabetic mice* (NOD). O NOD compartilha várias das características da doença com pacientes humanos. Por exemplo, as manifestações clínicas da doença são precedidas por inflamação nas ilhotas pancreáticas, ativação e expansão de células T autorreativas específicas para antígenos das ilhotas, participação de linfócitos T CD8⁺ nas lesões e presença de autoanticorpos contra o mesmo painel de autoantígenos (Yang & Santamaria, 2006). Vários aspectos imunológicos associados com o desenvolvimento de diabetes espontâneo no NOD são também descritos em modelo experimental murino induzido por estreptozotocina (STZ) (Nicoletti et al., 2000).

A estreptozotocina (STZ) é uma substância isolada do *Streptomyces achromogenes* que possui tanto atividade antibiótica de largo espectro quanto antineoplásica. É também um agente alquilante potente com capacidade de interferir no transporte de glicose e na função da glicoquinase e também de causar várias quebras no DNA (Rees & Alcolado, 2005). O diabetes pode ser induzido através da administração de dose única (concentração elevada) ou várias doses (baixa concentração) de STZ. Doses elevadas de STZ (250mg/kg) são extremamente tóxicas, pois esta substância é um agente alquilante que resulta em destruição das células β das ilhotas, induzindo um quadro fulminante de diabetes (Wood et al., 1999). Alternativamente, utilizando um esquema de múltiplas doses (*multiple low doses*: MLD-STZ) a toxicidade aguda não é observada, mas a autotolerância aos antígenos das ilhotas é abolida. Isto resulta em resposta imune humoral e celular para estes autoantígenos, especialmente para GAD65, insulina e hsp60 (Herold et al., 1997). Neste esquema, várias doses pequenas (40mg/kg) de STZ são aplicadas durante 5 dias consecutivos (MLD-STZ) para desencadear um quadro de diabetes autoimune similar ao humano (Castãno et al., 1990).

A administração de STZ em cepas de camundongos susceptíveis induz um quadro de diabetes que se assemelha à doença desenvolvida pelo NOD e pelos pacientes

humanos (Castão et al., 1990). MLD-STZ pode ser induzida em camundongos machos com determinados *backgrounds* genéticos como é o caso do C57BL/6. Em camundongos C57BL/6 a seguinte cinética de alterações tem sido caracterizada: degranulação de células β que ocorre após 2 ou 3 injeções, insulite sem hiperglicemia que se observa no 5º e 6º dias após as inoculações e finalmente quadro típico de diabetes, incluindo hiperglicemia, glicosúria e poliúria que ocorre alguns dias após. A insulite induzida desta forma é caracterizada por necrose de células β com infiltração de macrófagos e linfócitos (Lenzen, 2008). A inoculação de STZ, apesar de algumas limitações e críticas, é considerada um bom modelo para o estudo do diabetes mellitus (Like & Rossini, 1976).

1.5 Estratégias profiláticas específicas

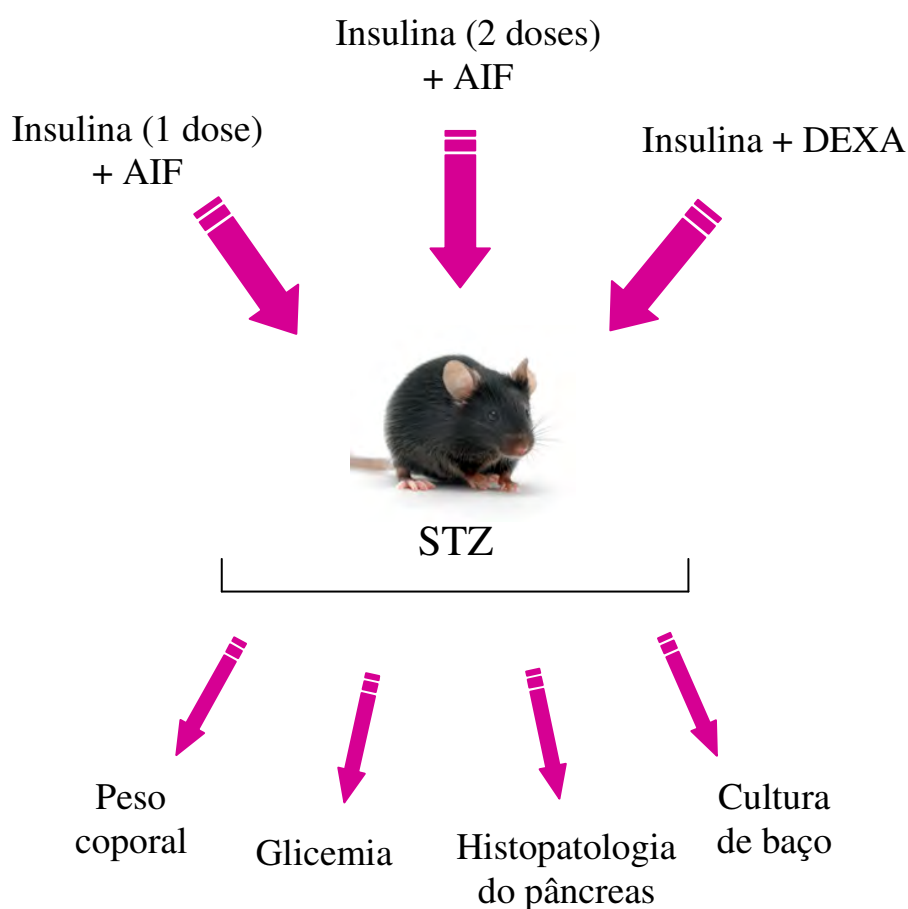
A vacinação com antígenos próprios para promover tolerância específica para autoantígenos (vacinação negativa) seria, teoricamente, a forma mais segura e desejada de evitar as patologias autoimunes. Estudos empregando roedores como modelo experimental mostram que a autotolerância pode ser induzida por diferentes estratégias tais como: administração do autoantígeno por via tolerogênica (mucosa, por exemplo); pelo bloqueio concomitante de moléculas co-estimulatórias ou por direcionamento do autoantígeno para APCs em repouso. Além disto, mesmo já iniciada, a resposta autoimune pode ainda ser diminuída ou bloqueada por indução de apoptose, anergia ou ativação de células T reguladoras.

Vários relatos mostraram que antígenos das ilhotas (insulina, GAD65 e seus derivados) administrados via mucosa (oral, nasal, aerossol) induziram proteção (Harrison, 2008). Esta proteção esteve associada com mudanças no padrão de resposta imune de Th1 para Th2 (Ploix et al., 1998) e com geração de células T reguladoras (Every et al., 2006).

Além da via mucosa, outras estratégias têm sido empregadas nos processos de vacinação negativa tais como associação dos autoantígenos com Adjuvante Incompleto de Freund (Hutchings & Cooke, 1998). Mais recentemente foi constatado que a presença de dexametasona pode restaurar a tolerância imunológica por indução de células T reguladoras (Unger et al., 2009).

1.6 Racional científico deste projeto

O objetivo desta proposta foi avaliar o potencial profilático de diferentes estratégias vacinais no controle do diabetes experimental induzido por estreptozotocina. Para isto testamos a administração de insulina em duas condições: associada ao Adjuvante Incompleto de Freund e na presença de dexametasona. Uns poucos relatos mostram que a associação de insulina com este adjuvante reduziu a expressão do diabetes, mas os mecanismos envolvidos não foram elucidados, pois estes trabalhos são mais antigos. Por outro lado poderíamos pressupor que a administração de insulina juntamente com dexametasona poderia induzir uma expansão seletiva de células T reguladoras, pois este fenômeno já foi observado no modelo NOD (Kang et al., 2008).



2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Objetivo geral: Avaliar o potencial profilático de estratégias tolerogênicas (antígeno-específicas) empregando insulina:

- Insulina + AIF
- Insulina + dexametasona

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito destes dois esquemas de imunização na evolução clínica do diabetes (peso e glicemia).
2. Avaliar o efeito destes esquemas de imunização na intensidade do processo inflamatório no pâncreas.
3. Avaliar o efeito modulador destes protocolos na produção de citocinas pelo baço.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, adultos, com 4 - 6 semanas de idade, provenientes do CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - UNICAMP. Os animais foram manuseados de acordo com os princípios estabelecidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 212/10-CEEA). Estes receberam ração comercial Nuvilab CR-1 (NUVITAL, PR) e água filtrada *ad libitum*. Foram acondicionados em caixas de polipropileno com maravalha branca de pinho autoclavada e mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, sob condições ambientais controladas (temperatura $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $55 \pm 20\%$, ciclo de luz claro/escuro 12/12h). Os animais foram submetidos a um período de 1 semana de aclimação antes dos experimentos. Os grupos experimentais foram constituídos de 5-6 animais.

3.2 Imunizações com insulina e Adjuvante Incompleto de Freund

A imunização com a insulina (cadeia B da insulina bovina, Sigma) associada ao AIF foi realizada através de dois protocolos cujas condições são informadas na tabela abaixo:

	Protocolo I	Protocolo II
Nº de doses	1 dose	2 doses
Concentração final de insulina/animal	500 µg/mL	1ª dose: 600 µg/mL 2ª dose: 1200 µg/mL
Via de administração	Administração subcutânea na área do pescoço (200µL)	Administração subcutânea nas regiões inguinais e axilares e no dorso (50 µL em cada lugar)

3.3 Imunização com insulina e dexametasona

Os camundongos foram injetados 4 vezes (dias 1, 4, 7 e 10) com dexametasona nas duas patas traseiras (8µg/pata). Na injeção do 7º dia, a cadeia B da insulina (20 µg/pata) foi coinjetada com dexta. Este regime foi repetido após 15 dias.

3.4 Indução de diabetes com estreptozotocina

Os camundongos foram tratados com 5 doses de estreptozotocina (0,1 mL) por via intraperitoneal (dias 0-5) na concentração 40 mg/kg de peso corpóreo/dia. A estreptozotocina foi preparada imediatamente antes das injeções, em tampão citrato. O tampão é composto de 0,1 mol/L de citrato trissódico e 0,1 mol/L de ácido cítrico; pH 4,5. A solução de STZ foi preparada imediatamente antes da injeção, coberta por papel alumínio e mantida em temperatura -20°C para evitar degradação. Os animais foram submetidos a jejum de 4-6 horas antes das inoculações.

3.5 Determinação da glicemia e peso corpóreo

A progressão do diabetes foi determinada pelo nível da glicose sanguínea (Glicosímetro Prestige Smart System). Níveis sanguíneos superiores a 200 mg/dl foram considerados indicativos de diabetes. A glicemia foi avaliada semanalmente, no período da manhã, em gota de sangue obtido da região mandibular.

O peso corpóreo foi avaliado duas vezes por semana no período da manhã.

3.6 Análise histopatológica do pâncreas

O pâncreas foi coletado após eutanásia e fixado em tampão fosfato contendo 10% de formalina durante 48 horas e, em seguida, submetido ao processo de desidratação em séries de etanol e xilol. O tecido foi incluído em blocos de Paraplast Plus (McCormick) e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos com 5 µm de espessura com auxílio de um micrótomo (Leica, RM2245). As lâminas foram coradas

com Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas em microscópio óptico Nikon e as imagens adquiridas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio.

Para a avaliação da intensidade do processo inflamatório, foram analisadas todas as ilhotas da lâmina e um sistema de “score” foi adotado para sua classificação: Grau 0 (ausência de infiltrado mononuclear), Grau 1 (infiltrado mononuclear pontual na periferia da ilhota), Grau 2 (infiltrado mononuclear moderado, disperso no interior da ilhota), Grau 3 (infiltrado mononuclear intenso e disperso no interior da ilhota, presença de células apoptóticas e perda de arquitetura normal das ilhotas).

3.7 Obtenção de sobrenadantes de culturas

Após o sacrifício dos animais, os baços foram retirados, divulsionados, as suspensões celulares lavadas com RPMI incompleto e o sedimento celular coletado através de centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. O número de células foi ajustado para 5×10^6 células/mL em meio RPMI contendo gentamicina e 10% de soro bovino fetal. Em seguida, as células foram distribuídas em placas de 48 poços (1 mL) e estimulados com Con A (10 µg/mL) ou insulina (10 µg/mL no 1º protocolo e 25 µg/mL no 2º protocolo). Após 48 horas de incubação a 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20° C para posterior dosagem de citocinas.

3.8 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.8.1 Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura

Placas de poliestireno (Nunc) de 96 poços foram recobertas com 100 µg/poço de solução contendo anticorpo de captura purificado anti-IFN-γ, IL-5 e IL-10 de camundongo, diluído em tampão fosfato de sódio (pH 9.0) na proporção 1:250. As placas foram incubadas a 4 °C, overnight. Após cinco lavagens com solução PBS – Tween 20 (0.05%), foram adicionados 200 µL/poço da solução de bloqueio, constituída de PBS – Tween com 10% de soro bovino fetal (SBF), com incubação por 1 hora, à temperatura ambiente. A curva padrão das citocinas (diluídas na base dois em

PBS/SBF10%) e as amostras foram adicionadas e as placas incubadas por 2h em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-citocina biotinilados e posteriormente com a estreptoavidina-peroxidase, ambos na proporção 1:250 em tampão PBS/SBF10% durante 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação revelada com o substrato H_2O_2 e o cromógeno OPD[®] (ortho-phenilenodiamina) e interrompida adicionando-se ácido sulfúrico 2N. A leitura da absorbância foi realizada em 492 nm em leitor de ELISA.

3.9 Análise estatística

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média $\pm$ erro médio. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA e quando necessário, o Teste de Tukey. Para as variáveis não paramétricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%.

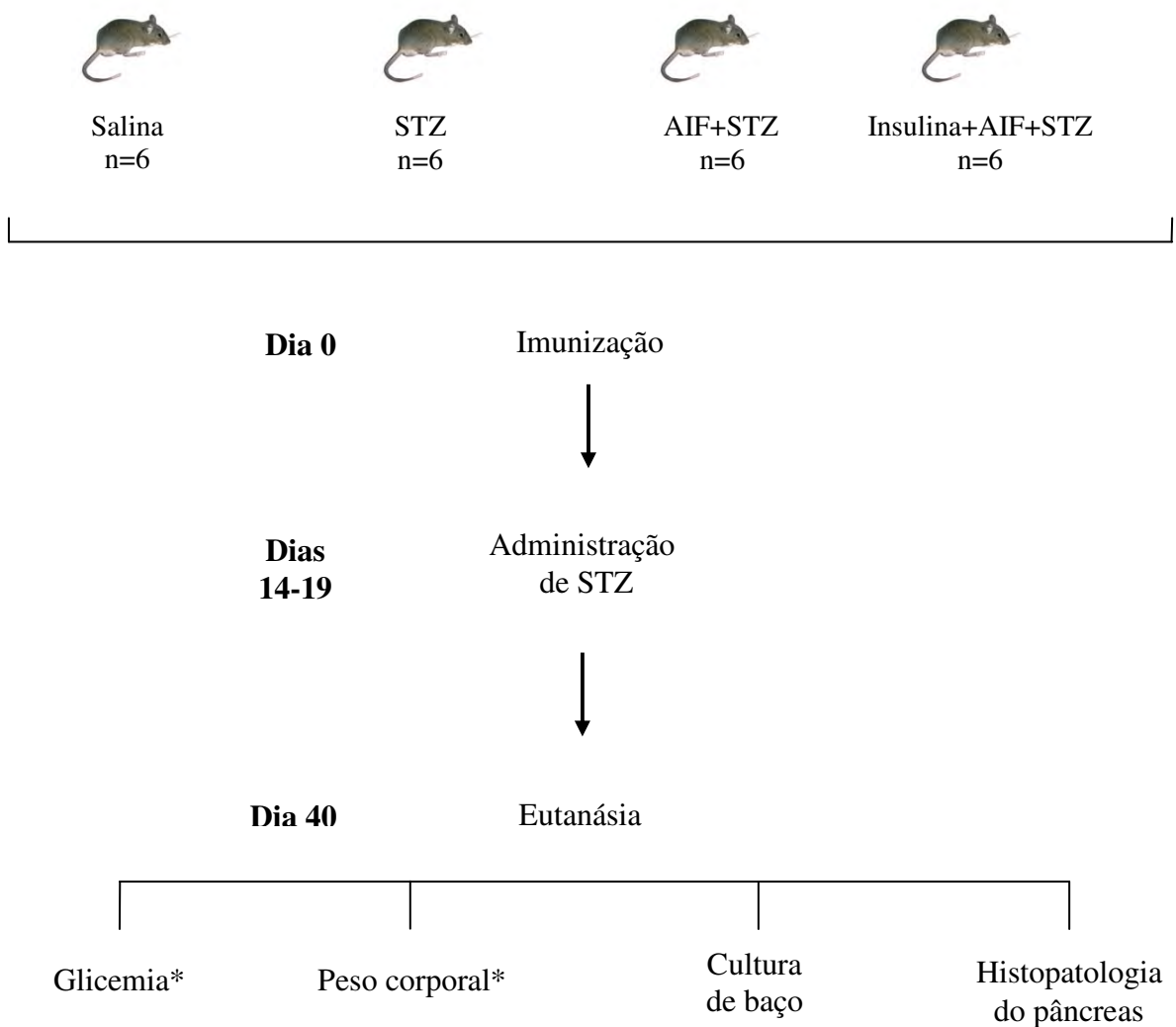
Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows version 2.0 1995, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA.

4. Protocolos experimentais e resultados

Para atingir os objetivos propostos anteriormente, utilizamos os protocolos experimentais I e II esquematizados a seguir. Para facilitar a compreensão, os resultados serão sempre precedidos de seus respectivos protocolos.

4.1 Protocolo Experimental I

Objetivo: Avaliar o potencial profilático da estratégia tolerogênica empregando 1 dose de insulina associada ao Adjuvante Incompleto de Freund (AIF)



*Glicemia e peso corpóreo dos animais foram determinados 1 e 2 vezes por semana, respectivamente, após a administração da STZ.

4.1.1 Resultados do Protocolo Experimental I

A. Avaliação do peso corporal

A variação de peso dos animais entre os dias 0 (anterior ao período de indução do diabetes) e 20 (tempo decorrido após a última dose de STZ) pode ser observada na figura 1. Como pode se ver, ocorreu ganho de peso no grupo controle (normal), mas não nos 3 grupos com diabetes, no decurso do experimento. A variação de peso corporal observada entre o dia 0 e o 20º dia é ilustrada na figura 2. Este gráfico mostra que os animais do grupo Controle apresentaram um ganho de cerca de 20% do peso corpóreo. Os animais do grupo STZ apresentaram um ganho de cerca de 1%. Os do grupo AIF+STZ apresentaram uma perda de cerca de 2% e o grupo Insulina+AIF+STZ ganhou por volta de 2% do seu peso corpóreo inicial. A variação do peso entre os 3 grupos diabéticos não foi significativa, entretanto, estes grupos apresentaram ganho de peso significativamente menor do que o grupo Controle.

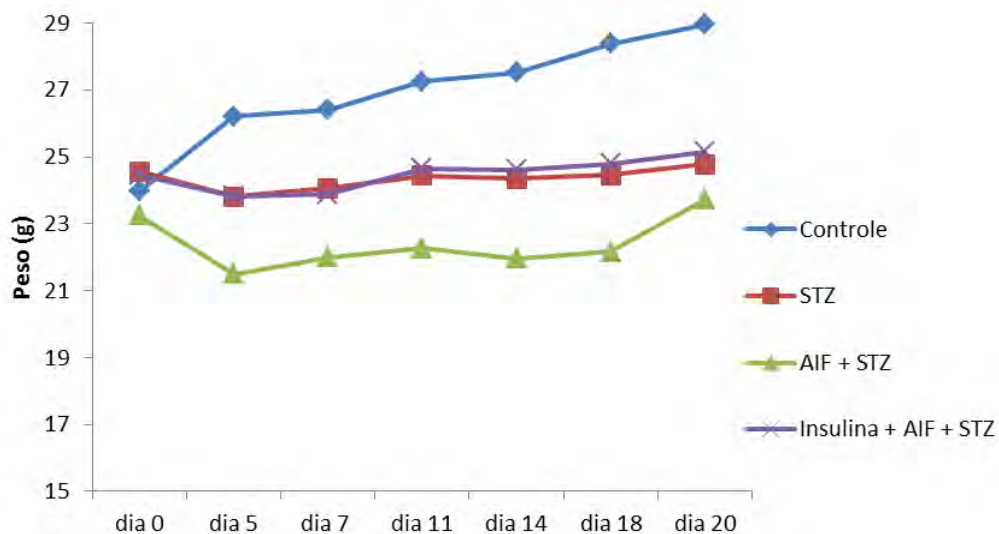


Figura 1. Efeito da imunização prévia com insulina associada ao AIF na evolução do peso corporal de camundongos com diabetes. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com insulina associada ao Adjuvante Incompleto de Freud e posteriormente submetidos à indução do diabetes com STZ. Os valores mostrados representam a média obtida de 5 animais por grupo.

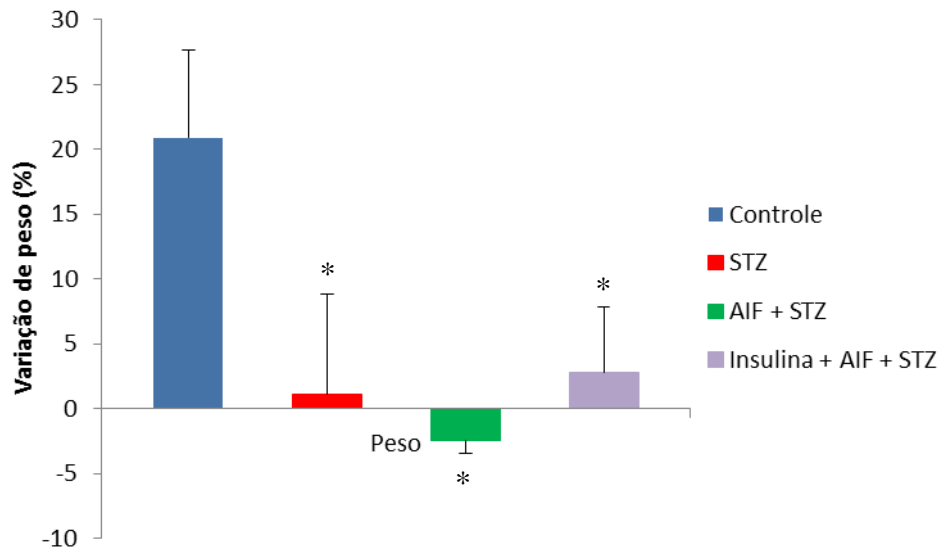


Figura 2. Variação de peso corpóreo em camundongos C57BL/6 entre os dias 0 (antes da inoculação de STZ) e 20 (depois da inoculação). * Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p=0,009$). Média $\pm$ erro médio de 5 animais por grupo.

B. Avaliação dos níveis glicêmicos

A evolução da glicemia durante o período experimental após a indução do diabetes é mostrada na figura 3. Como pode se observar, no 7º dia após o último dia de indução de diabetes, os animais dos grupos STZ e AIF+STZ já apresentavam nível glicêmico acima dos 200mg/dl, caracterizando um estado diabético. Neste mesmo período, o nível glicêmico no grupo Insulina+AIF+STZ já estava elevado, mas ainda abaixo de 200mg/dl. A partir do 14º dia de avaliação, todos os grupos injetados com STZ apresentaram glicemias semelhantes entre si. Como esperado, os níveis glicêmicos estavam dentro da faixa normal nos animais do grupo Controle (normal).

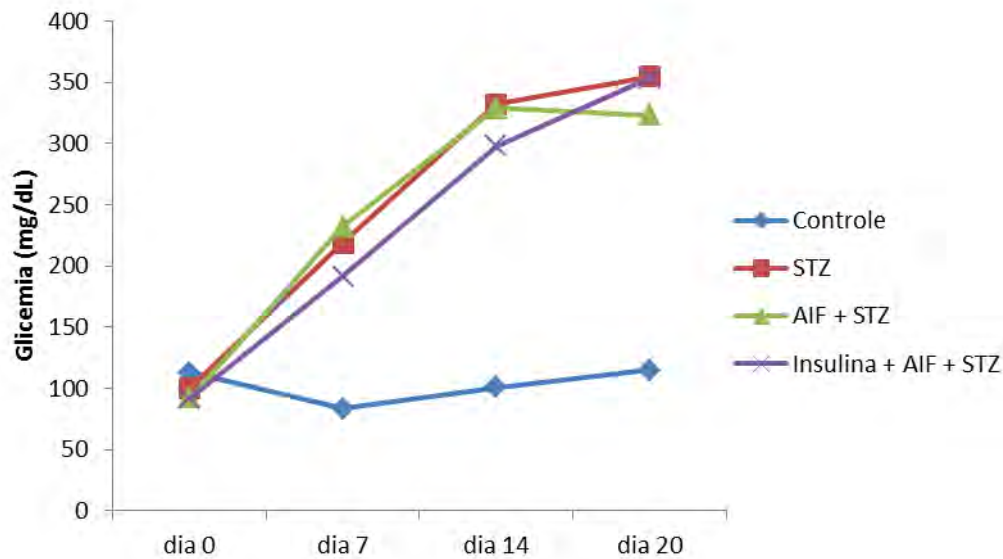


Figura 3. Efeito da imunização com insulina associada ao Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) nos níveis glicêmicos. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com insulina associada ao AIF. 14 dias depois, os animais foram injetados com 5 doses de STZ. Os níveis glicêmicos foram avaliados semanalmente com o Glicosímetro Prestige Smart System e os valores acima de 200mg/dl foram considerados evidência de diabetes. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo.

C. Análise histopatológica do pâncreas

O resultado do infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas é mostrado na tabela 1. Como pode-se observar, o processo inflamatório nos grupos AIF+STZ e Insulina+AIF+STZ foi similar. Entretanto, estes dois grupos apresentaram duas diferenças em relação ao grupo STZ. Nestes animais previamente imunizados, a porcentagem de insulite grau 3 foi menor. Além disto, também observamos uma pequena porcentagem de ilhotas intactas (grau 0), o que não ocorreu no grupo STZ. Não foram observadas diferenças importantes entre os grupos AIF+STZ e Insulina+AIF+STZ.

Os diferentes graus de insulite observados no modelo experimental utilizado estão ilustrados na figura 5.

Tabela 1. Efeito da imunização prévia com insulina associada ao AIF na gravidade da insulite induzida por STZ em camundongos C57BL/6.

	Grau 0 (%)	Grau 1 (%)	Grau 2 (%)	Grau 3 (%)
STZ	0	15,2	49,3	35,5
AIF+STZ	9,6	32,3	41,9	16,2
INS + AIF + STZ	4,1	19,5	62,8	13,6

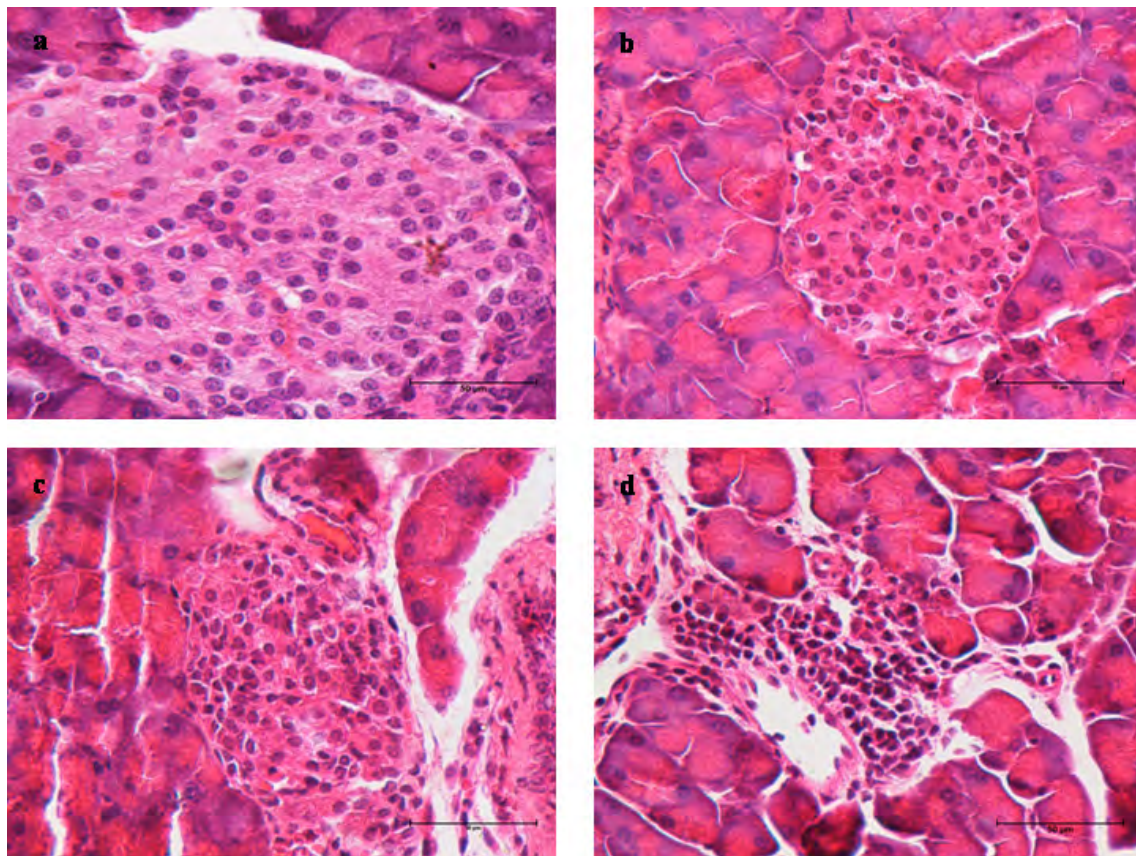


Figura 4. Diferentes graus de insulite nas ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6 inoculados com STZ. Ilhota grau 0 em animais controle (a), ilhota grau 1 (b), grau 2 (b) e grau 3(d). Alterações detectadas 21 dias após a última dose de STZ. Aumento de 40x.

D. Avaliação da produção de citocinas

A resposta imune celular foi avaliada através das dosagens de IFN- γ , IL-5 e IL-10 em culturas de células esplênicas estimuladas com insulina e Con A. Os valores encontrados nas culturas não estimuladas, ou seja, adicionadas só com meio de cultura, estavam abaixo dos níveis de detecção e não foram, por esta razão, incluídos nos gráficos apresentados.

Em relação à produção IFN- γ , foi possível detectá-lo em sobrenadantes de células esplênicas tanto de animais imunizados quanto de animais normais estimuladas com Con A (figura 5), porém sem diferença estatística entre os grupos. Não detectamos produção de IFN- γ nas culturas de células esplênicas estimuladas com insulina (dados não mostrados).

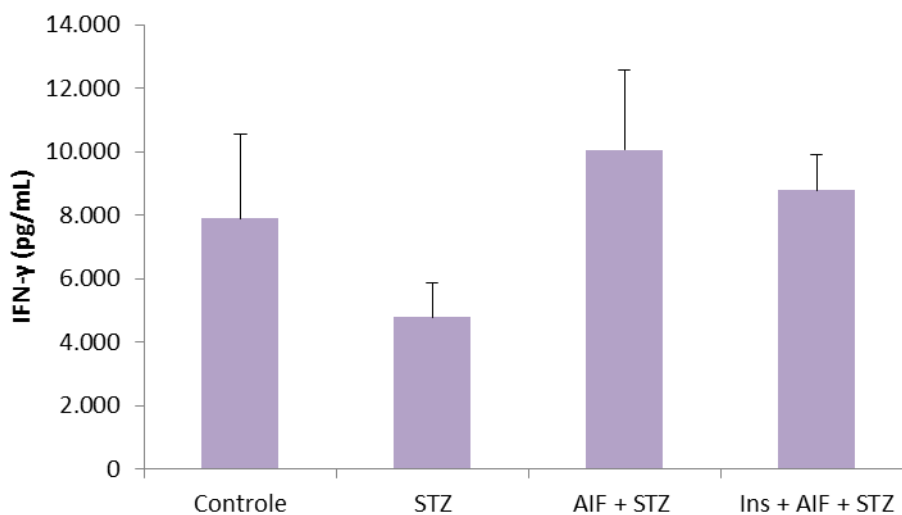


Figura 5. Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados com insulina antes da indução do diabetes por STZ. Resultados referentes às culturas estimuladas *in vitro* com Con A. Os resultados representam a média $\pm$ erro médio de 5 animais por grupo.

IL-5 foi detectada em culturas de células esplênicas estimuladas com Con A (figura 6). Não foi detectada diferença estatística entre os grupos, mas os valores sugerem que ocorreu uma queda na produção de IL-5 no grupo STZ e uma recuperação dos níveis de IL-5 no grupo Insulina+AIF+STZ. Em relação ao estímulo com insulina, não detectamos a produção desta citocina.

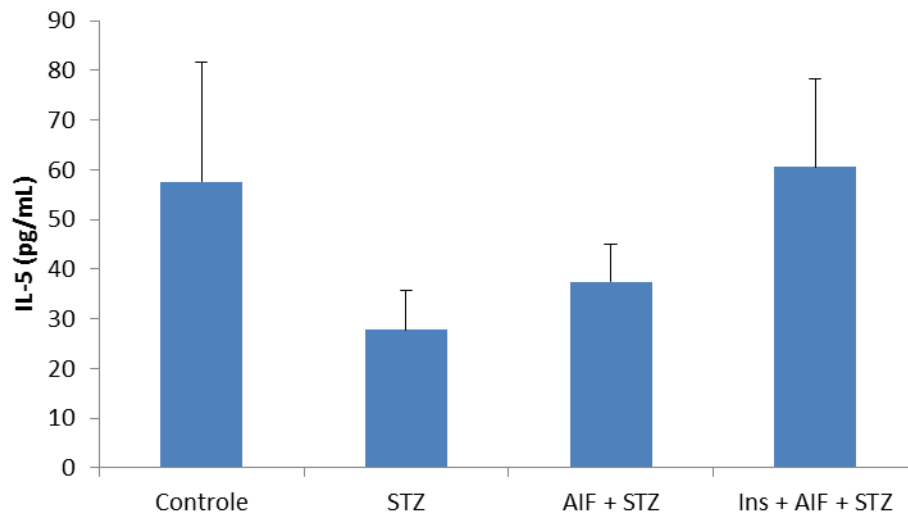


Figura 6. Produção de IL-5 por células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados com insulina antes da indução do diabetes por STZ. Resultados referentes às culturas estimuladas *in vitro* com Con A. Os resultados representam a média $\pm$ erro médio de 5 animais por grupo.

Nas culturas de células esplênicas re-estimuladas *in vitro* com insulina, observamos que os níveis de IL-10 estavam significativamente mais elevados nos grupos AIF+STZ e Insulina+AIF+STZ. Apesar de não existir diferença estatística entre os níveis desta citocina nos grupos AIF+STZ e Insulina+AIF+STZ, a produção média desta citocina foi mais elevada no grupo imunizado com insulina (Figura 7a).

A produção de IL-10 nas culturas esplênicas estimuladas com Con A foi similar nos quatro grupos (figura7b).

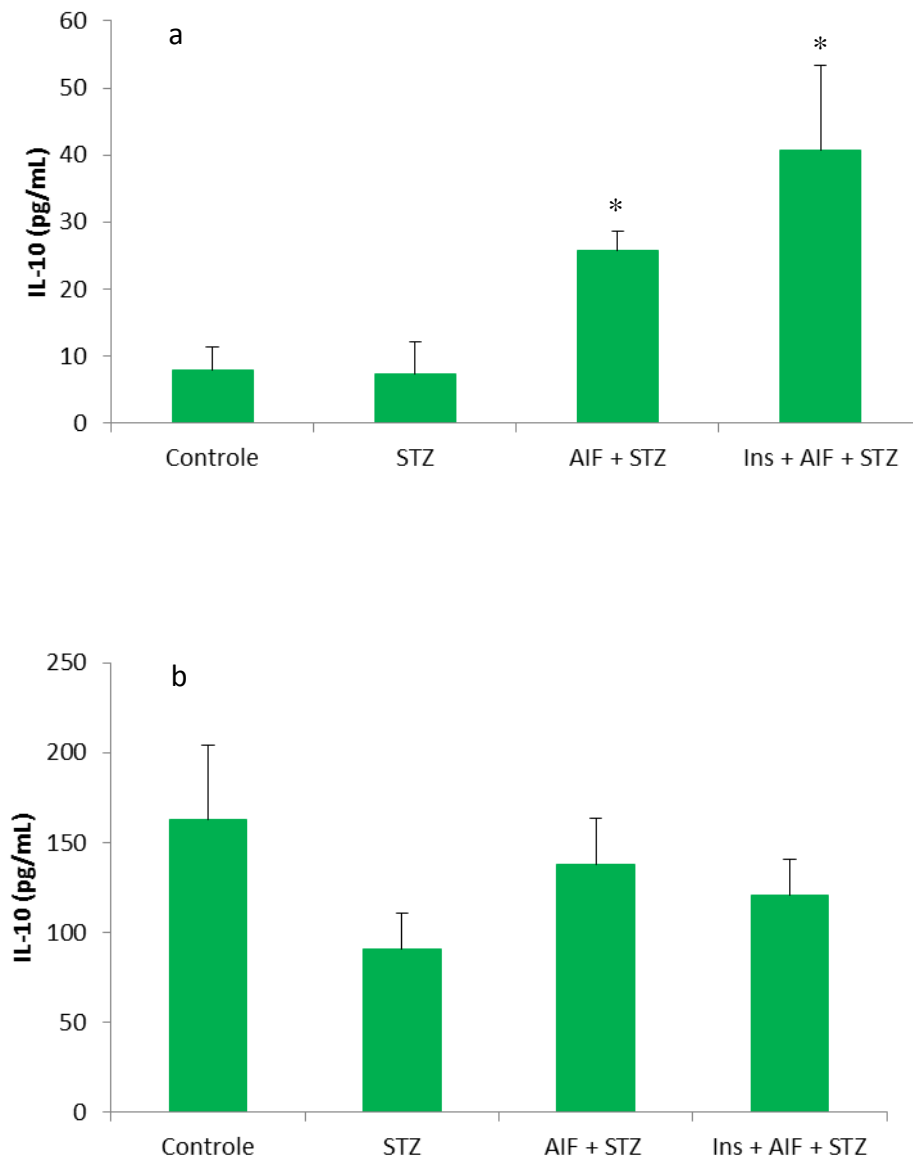
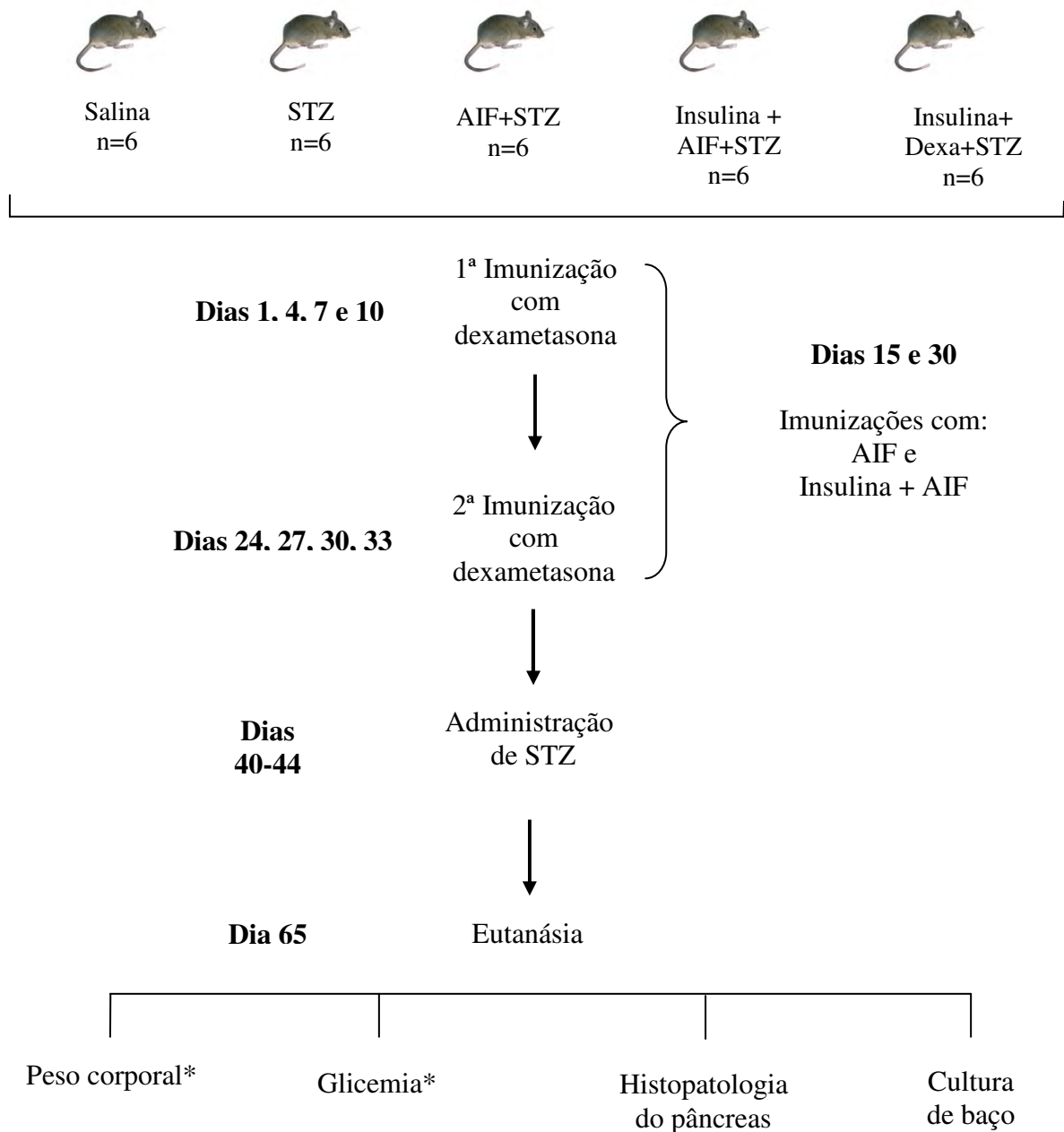


Figura 7. Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados com insulina antes da indução do diabetes por STZ. Resultados referentes às culturas estimuladas *in vitro* com insulina (a) e Con A (b). *Representa diferença estatística em relação aos grupos controle e STZ ($p < 0,05$). Os resultados representam a média $\pm$ erro médio de 5 animais por grupo.

4.2 Protocolo Experimental II

Objetivo: Avaliar o potencial de duas estratégias tolerogênicas: 1) 2 doses de insulina+AIF e 2) Insulina associada com a dexametasona.



*Glicemia e peso corpóreo dos animais foram determinados 1 e 2 vezes por semana, respectivamente, após a administração da STZ.

4.2.1 Resultados do Protocolo Experimental II

A. Avaliação do peso corporal

A variação de peso dos animais entre os dias 0 (anterior ao período de indução do diabetes) e 20 (tempo decorrido após a última dose de STZ) pode ser observada na figura 8. Ocorreu ganho de peso no grupo controle, mas não nos grupos injetados com STZ. A variação de peso constatada entre o dia 0 e o 20º dia é mostrada na figura 9. Neste caso, os animais do grupo Controle apresentaram um ganho de cerca de 12% do peso corpóreo; já os animais do grupo STZ apresentaram perda de cerca de 4%. Os do grupo AIF+STZ apresentaram uma perda de cerca de 2% e o grupo Insulina+AIF+STZ perdeu por volta de 4% do seu peso corpóreo inicial, enquanto o grupo Insulina+dexa+STZ ganhou aproximadamente 2%. A variação de peso entre os quatro grupos diabéticos não foi significativa, entretanto, os grupos STZ e Insulina+AIF+STZ apresentaram perdas significativas em relação ao grupo Controle.

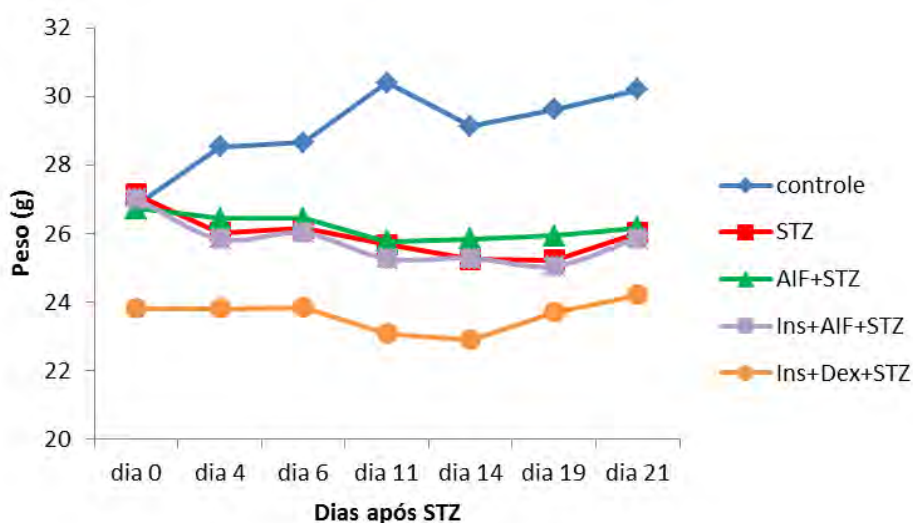


Figura 8. Efeito da imunização prévia com insulina no peso corporal de camundongos com diabetes. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com insulina+AIF ou com insulina associada à dexametasona e posteriormente submetidos à indução do diabetes com STZ. Os valores mostrados representam a média obtida de 6 animais por grupo.

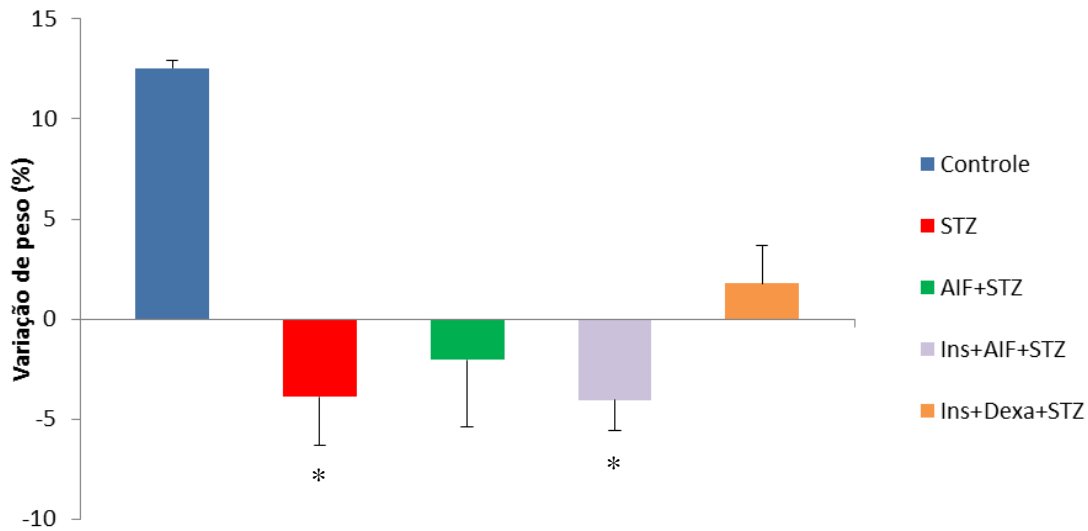


Figura 9. Variação de peso corpóreo em camundongos C57BL/6 entre os dias 0 (antes da inoculação de STZ) e 20 (depois da inoculação). * Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Média de 6 animais por grupo.

B. Avaliação dos níveis glicêmicos

A evolução da glicemia durante o período experimental após a indução do diabetes é mostrada na figura 10. Como pode se observar, no 12º dia após o último dia de indução de diabetes, todos os grupo tratados com STZ apresentavam nível glicêmico acima de 200mg/dl, caracterizando um estado diabético, porém os animais do grupo Insulina+dexa+STZ estavam com a glicemia um pouco menos acentuada. Todos os grupos apresentaram glicemia similar no 21º dia. Como esperado, os níveis glicêmicos estavam dentro da faixa normal nos animais do grupo Controle (normal).

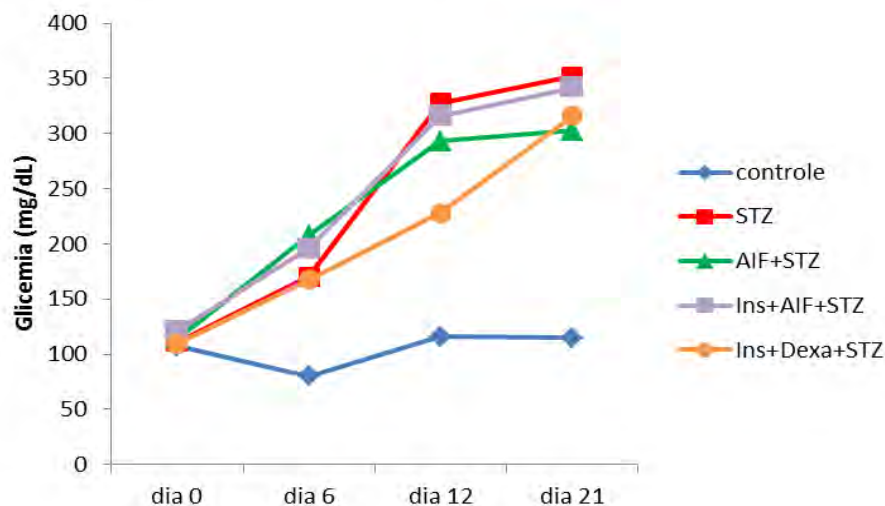


Figura 10. Efeito da imunização com insulina nos níveis glicêmicos. Os níveis glicêmicos foram avaliados semanalmente com o Glicosímetro Prestige Smart System e os valores acima de 200mg/dl foram considerados evidência de diabetes. Resultados representam a média de 6 animais por grupo.

C. Análise histopatológica do pâncreas

A análise comparativa do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas dos animais diabéticos não indicou proteção nos grupos imunizados com insulina associada ao AIF ou à dexametasona. Em todos os grupos visualizamos os graus 1, 2 e 3 de infiltração e a análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos. Estes resultados podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Efeito da imunização com insulina associada ao AIF ou à dexametasona no grau de comprometimento das ilhotas em camundongos C57BL/6 inoculados com STZ.

	Grau 0 (%)	Grau 1 (%)	Grau 2 (%)	Grau 3 (%)
STZ	1,1	27,54	56,60	14,76
AIF+STZ	2,63	41,94	40,25	15,18
INS + AIF + STZ	7,71	33,19	45,35	13,75
INS + Dexa + STZ	0	33,37	46,45	20,18

D. Avaliação da produção de citocinas

A resposta imune celular foi avaliada através das dosagens de IFN- γ , IL-5 e IL-10 em culturas de células esplênicas estimuladas com insulina e Con A.

Níveis elevados de IFN- γ foram detectados nas culturas esplênicas estimuladas tanto com insulina quanto com Con A, mas não ocorreu diferença estatística entre os grupos.

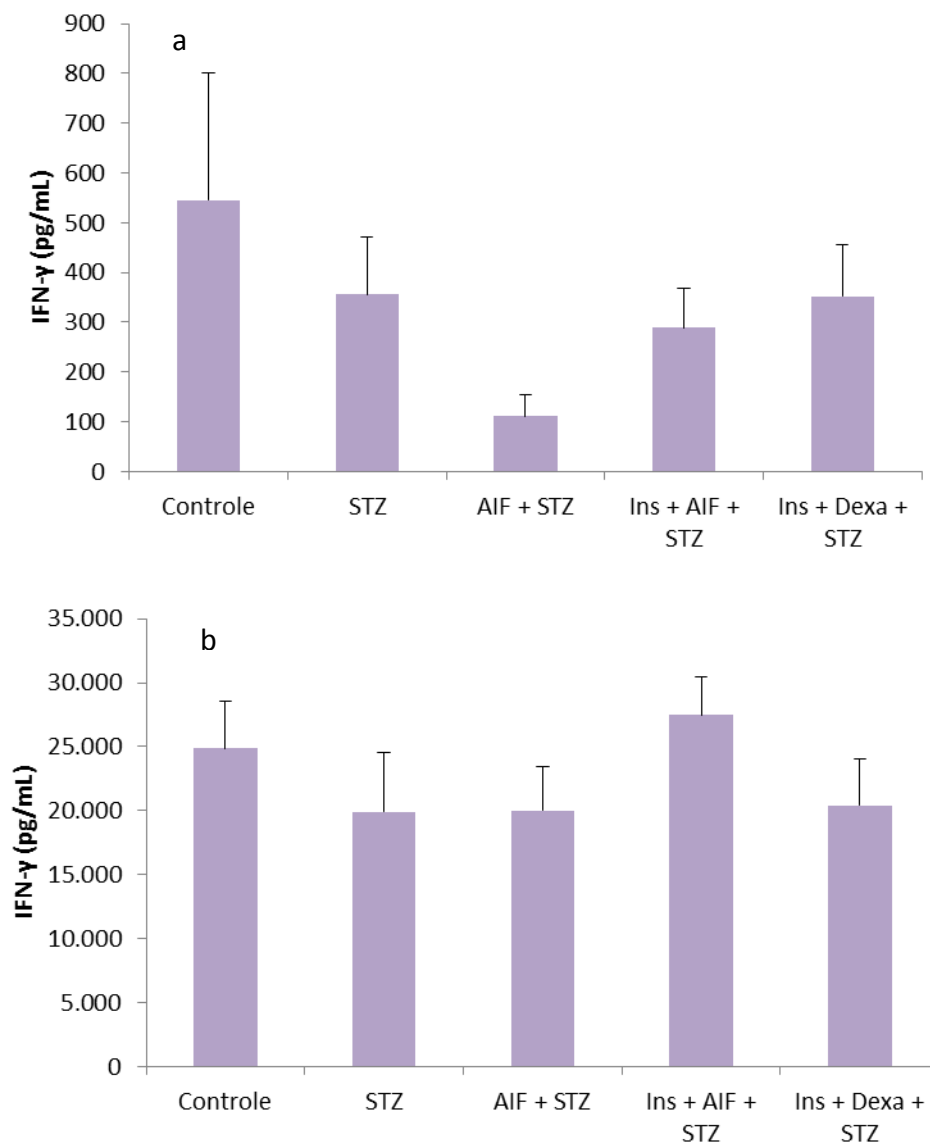


Figura 11. Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados com insulina antes da indução do diabetes por STZ. Resultados referentes às culturas estimuladas *in vitro* com insulina (a) e Con A (b). Os resultados representam a média $\pm$ erro médio de 6 animais por grupo.

Os níveis de IL-5 foram similarmente elevados nas culturas estimuladas com Con A (figura 12). Nas culturas estimuladas com insulina não detectamos a presença desta citocina (dados não mostrados).

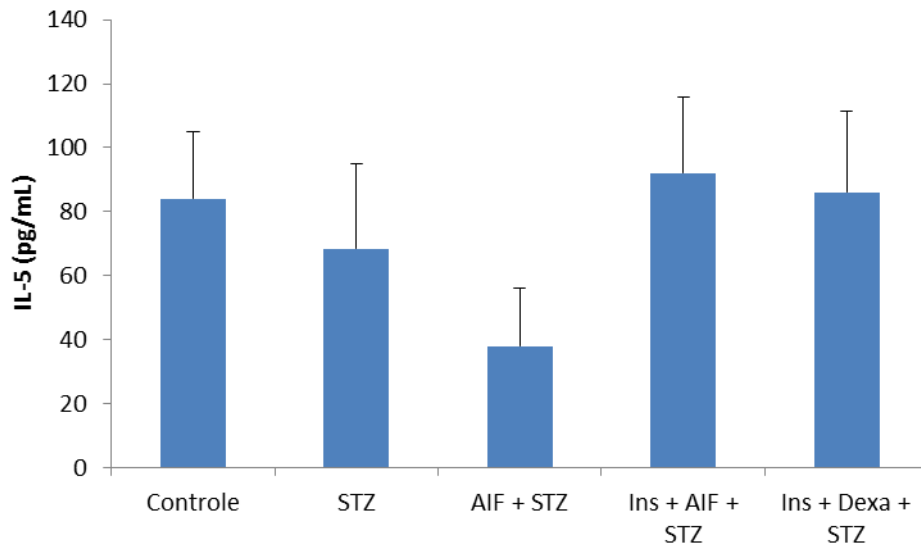


Figura 12. Produção de IL-5 por células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados com insulina antes da indução do diabetes por STZ. Resultados referentes às culturas estimuladas *in vitro* com Con A. Os resultados representam a média $\pm$ erro médio de 6 animais por grupo.

Quanto à IL-10, detectamos sua produção tanto em células esplênicas estimuladas *in vitro* com insulina (figura 13a) como com Con A (figura 13b), entretanto, não ocorreu diferença estatística entre os grupos.

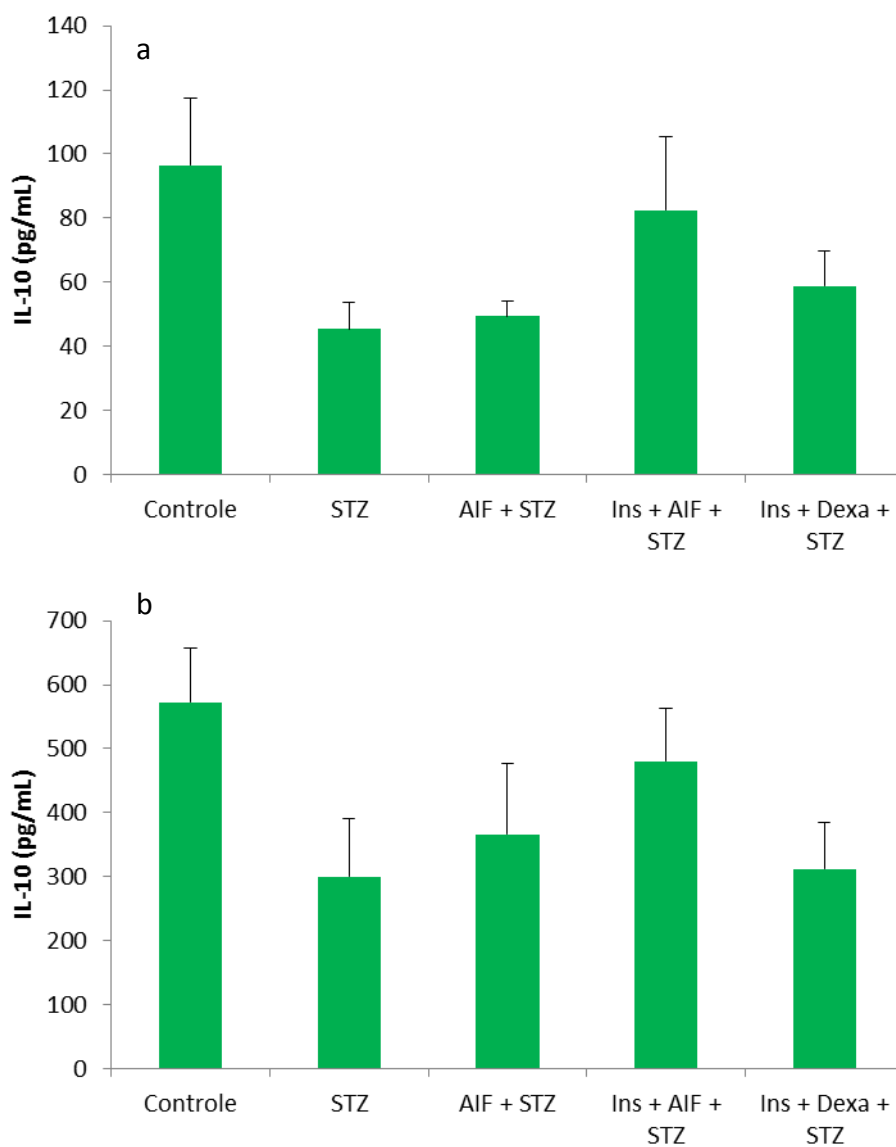


Figura 13. Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados com insulina antes da indução do diabetes por STZ. Resultados referentes às culturas estimuladas *in vitro* com insulina (a) e Con A (b). Os resultados representam a média $\pm$ erro médio de 6 animais por grupo.

5. Discussão

O diabetes mellitus tipo 1 é a forma de diabetes que resulta da destruição autoimune das células β pancreáticas e que causa consequentemente queda acentuada da produção de insulina. A baixa produção de insulina resulta em nível aumentado de glicose no sangue e na urina. O único tratamento disponível para a DM1 é a administração de insulina.

O processo de destruição das células β tem sido associado com ativação de células B, Th1, Tc e macrófagos (Thayer et al., 2010) específicas para os antígenos das ilhotas, tais como insulina, GAD65 e IA-2 (Nicholas et al., 2011). Neste contexto, existe um grande interesse por estratégias imunomoduladoras específicas capazes de impedir o surgimento ou a evolução deste tipo de patologia autoimune.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial profilático de duas estratégias vacinais baseadas na imunização com insulina em condições tolerogênicas. Como condições tolerizantes utilizamos a adição de Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e de dexametasona (dexa). Como modelo experimental empregamos o diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) em camundongos C57BL/6, que tem sido descrito como um modelo que envolve uma resposta autoimune (Lenzen, 2008). Teoricamente, nestas condições de tolerização específica, ocorreria uma proteção pelo menos parcial, pois a insulina é um dos antígenos-alvo neste processo autoimune.

Para realizar esta avaliação, os animais foram imunizados com a cadeia B da insulina associada ao AIF ou à dexametasona e posteriormente submetidos à indução de diabetes com doses múltiplas e baixas de STZ. A avaliação do efeito protetor foi realizada em diferentes períodos após a indução do diabetes, dependendo do parâmetro em análise: glicemia e peso corporal foram determinadas semanalmente e histopatologia pancreática e produção de citocinas por células esplênicas foram realizadas no final da avaliação (21 dias após a última injeção de STZ).

Inicialmente os animais foram imunizados com insulina associada ao Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e depois submetidos à indução do diabetes. Este procedimento não impediu o aumento da glicemia e os animais não ganharam peso. Entretanto, esta imunização prévia com insulina associada ao AIF determinou alterações imunológicas interessantes na produção de citocina caracterizada por produção aumentada de IL-5 e IL-10 por células esplênicas. Este aumento nos níveis de IL-5 foi detectado só em culturas estimuladas com Con A enquanto que o aumento de IL-10 foi

detectado só nas culturas estimuladas com insulina. Este efeito imunomodulador nas citocinas foi acompanhado de insulite mais discreta, caracterizada pela presença de ilhotas sem infiltração (grau 0) e menor percentual de ilhotas com grau 3.

É importante, entretanto, ressaltar que tanto o efeito imunorregulador quanto o anti-inflamatório também foram observados no grupo controle injetado só com AIF. Não fizemos uma análise quantitativa entre os grupos Ins+AIF+STZ e AIF+STZ que permitisse uma comparação entre esses dois grupos. Porém, os resultados observados sugerem que a associação com a insulina determina aumento na atividade protetora do AIF, indicando um possível efeito aditivo. Estes resultados são coerentes com os dados da literatura que indicam que o AIF é amplamente utilizado em combinação com peptídeos e proteínas para induzir tolerância. Contudo, esporadicamente tem sido descrito que o próprio AIF possui propriedades inibidoras como foi relatado em artrite induzida por adjuvante, em diabetes espontâneo e também em encefalite experimental (Zamora et al., 2002)

Este efeito imunomodulador e anti-insulite da imunização com insulina associada ao AIF não tem sido estudado no modelo de diabetes por STZ. No entanto, resultados similares e significativos, foram descritos em camundongos NOD, imunizados com insulina associada a este adjuvante. Muir et al., 1995, demonstraram que a imunização com insulina ou com a cadeia B, que é metabolicamente inativa, associada ao Adjuvante Incompleto de Freund, preveniu o diabetes em camundongos NOD. Os autores comprovaram que esta proteção era mediada por um mecanismo específico envolvendo a cadeia B, uma vez que a inoculação da cadeia A ou de BSA não teve efeito protetor. O efeito protetor esteve associado com baixa produção de IFN- γ nas lesões presentes nas ilhotas. Como não realizamos este tipo de avaliação *in situ*, não podemos fazer uma análise comparativa direta com este trabalho. Apesar disso, de forma similar, constatamos que a imunização com insulina associada ao AIF também determinou um efeito imunorregulador pelo estímulo específico. A menor gravidade do processo inflamatório nos animais previamente imunizados com insulina+AIF ou somente inoculados com AIF pode ter sido determinado pela migração de células produtoras de IL-10 para as ilhotas. Seguindo este mesmo tipo de estratégia, Ramiya et al., 1997 demonstraram que GAD65, diferentemente da insulina, associado ao AIF não protegeu contra o diabetes espontâneo no NOD, sugerindo desta forma que a escolha do autoantígeno envolvido é de importância fundamental nestas estratégias tolerogênicas.

Vários ensaios clínicos têm sido baseados no uso de insulina como autoantígeno tolerizante, pois este é o autoantígeno iniciador do diabetes no modelo NOD e também o principal autoantígeno no homem. Estes ensaios de fase I confirmaram as informações obtidas nos modelos animais de que a cadeia B associada ao AIF é segura e pode induzir células T reguladoras (Tregs) específicas até dois anos depois da vacinação (Van Belle et al., 2011). Um achado muito interessante foi recentemente descrito por Orban et al., 2010. Estes autores constataram a presença de Tregs específicas para insulina em pacientes imunizados com a cadeia B associada ao AIF.

Em função destes resultados hipotetizamos que uma tolerização mais acentuada, com 2 doses de insulina, poderia ser mais eficaz. Para testar esta possibilidade imunizamos os animais com duas doses (75 µg e 150 µg) de insulina associadas ao AIF. Entretanto, diferentemente do previsto, estes efeitos modulador e protetor foram perdidos quando as doses de insulina foram aumentados. A explicação mais imediata para esta perda do efeito protetor é que a proteção observada foi dependente da dose. Os achados de Ishikawa et al., 2007, suportam, pelo menos parcialmente, esta possibilidade. Estes autores constataram que a administração oral de autoanticorpo monoclonal anti-CD3 suprimiu a incidência de diabetes induzida por STZ em camundongos AKR. Este efeito foi claramente dependente de dose, sendo a dose mais baixa (50µg) bem mais eficaz do que a dose de 250µg. Este tipo de achado é relevante pois indica que as estratégias imunorreguladoras visando o controle de processos autimunes são dependentes de dose.

Na última etapa deste trabalho avaliamos o possível efeito protetor da imunização prévia com insulina associada à dexametasona. A sustentação científica desta proposta é bastante convincente, pois existem várias evidências de que este agente imunossupressor pode atuar como um adjuvante tolerogênico quando associado ao autoantígeno. Este efeito tolerizante ocorreria principalmente através da modulação de células dendríticas e de um efeito amplificador na subpopulação de Tregs (Van Kooten et al., 2009).

Apesar deste forte embasamento científico, o procedimento realizado neste projeto não resultou em proteção evidente contra o diabetes. Nossos resultados também são discordantes quando comparados com os obtidos no modelo NOD. Kang et al., 2008 comprovaram que a imunização de camundongos NOD com peptídeo derivado da cadeia B da insulina (B:9-23) preveniu o aparecimento da hiperglicemia. Os autores também observaram o aparecimento de Tregs antígeno específicas nestes animais.

É possível que esta não proteção esteja relacionada com o protocolo de imunização adotado ou, alternativamente, com as características do modelo de diabetes induzido por STZ.

Tomadas em conjunto, os dados obtidos indicam que o protocolo de imunização utilizando uma dose de insulina associada ao AIF apresentou potencial imunorregulador mais acentuado. Entretanto, este efeito parece ser, em grande parte, mediado pelo próprio AIF.

6. Referências Bibliográficas

1. Castaño L, Eisenbarth GS. Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. **Annu Rev Immunol** 1990; 8:647-79.
2. Emamaille JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. **Diabetes** 2009; 58:1302-11.
3. Every AL, Kramer DR, Mannering SI, Lew AM, Harrison LC. Intranasal vaccination with proinsulin DNA induces regulatory CD4+ T cells that prevent experimental autoimmune diabetes. **J Immunol** 2006; 176:4608-15.
4. Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes. **Immunol Rev** 2005; 204:232-49.
5. Harrison, LC. Vaccination against self to prevent autoimmune disease: the type 1 diabetes model. **Immunol Cell Biol** 2008; 86:139–145.
6. Herold KC, Baumann E, Vezys V, Buckingham F. Expression and immune response to islet antigens following treatment with low doses of streptozotocin in H-2d mice. **J Autoimmun** 1997; 10:17-25.
7. Hutchings P, Cooke A. Protection from insulin dependent diabetes mellitus afforded by insulin antigens in incomplete Freund's adjuvant depends on route of administration. **J Autoimmun** 1998; 11:127-30.
8. Ishikawa H, Ochi H, Chen ML, Frenkel D, Maron R, Weiner HL. Inhibition of autoimmune diabetes by oral administration of anti-CD3 monoclonal antibody. **Diabetes**. 2007 Aug;56(8):2103-9.
9. Kank Y, Xu L, Wang B, Chen A, Zheng G. Cutting edge: Immunosuppressant as adjuvant for tolerogenic immunization. **J. Immunol**. 2008;180:5172-6.
10. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**. 2008; 51(2):216-26. [Epub 2007 Dec 18]
11. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science**. 1976; 193(4251):415-7.
12. Liu E, Li M, Jasinski J, Kobayashi M, Gianani R, Nakayama M, Eisenbarth GS. Deleting islet autoimmunity. **Cell Biochem Biophys** 2007; 48:177-82.
13. Maiese K, Shang YC, Chong ZZ, Hou J. Diabetes Mellitus: Channeling Care through Cellular Discovery. **Curr. Neurovasc Res**. 2010; 7(1):59-64

14. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. **Nat Med** 2001;7:899–905.
15. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Lunchetta R, Kricher J, Marclaren N. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. **J Clin Invest.** 1995; 95:628-34
16. Nicholas D, Odumosu O, Landridge WH. Autoantigen based vaccines for type 1 diabetes. **Discov Med.** 2011; 11(59):293-301
17. Nicoletti F, Di Marco R, Conget I, Gomis R, Edwards C 3rd, Papaccio G, Bendtzen K, Sandler S. Sodium fusidate ameliorates the course of diabetes induced in mice by multiple low doses of streptozotocin. **J Autoimmun** 2000; 15:395-405.
18. Orban T, Farkas K, Jalahej H, Kis J, Treszl A, Falk B, Reijonen H, Wolfsdorf J, Ricker A, Matthews JB, Tchao N, Sayre P, Bianchine P. Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy. **J Autoimmun.** 2010; 34(4):408-15.
19. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. **Nat Rev Immunol.** 2002; 2:37–45.
20. Ploix C, Bergerot I, Fabien N, Perche S, Moulin V, Thivolet C. Protection against autoimmune diabetes with oral insulin is associated with the presence of IL-4 type 2 T-cells in the pancreas and pancreatic lymph nodes. **Diabetes** 1998; 47:39-44.
21. Ramiya VK, Shang XZ, Phariss PG, Wasserfall CH, Stabler TV, Muir AB, Schatz DA, Maclaren NK. Antigen based therapies to prevent diabetes in NOD mice. **J Autoimmun.** 1996; 9:349-56
22. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. **Diabet Med** 2005; 22:359-70.
23. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure. **Diabetologia** 2003; 46:305-21.
24. Thayer TC, Wilson SB, Mathews CE. Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 2010; 39(3):541-61.
25. Unger WW, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Regulatory T cells by Monocyte-derived Dendritic Cells Modulated by VitaminD(3) or Dexamethasone: differential role for PD-L1. **Eur J Immunol** 2009; 39:3147-59.

26. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev**. 2011 Jan;91(1):79-118.
27. van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev** 2007; 23:169-83.
28. van Kooten C, Stax AS, Woltman AM, Gelderman KA. Handbook of experimental pharmacology "dendritic cells": the use of dexamethasone in the induction of tolerogenic DCs. **Handb Exp Pharmacol**. 2009; (188):233-49.
29. Wood SC, Rao TD, Frey AB. Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/c By mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. **Cell Immunol** 1999; 192:1-12.
30. Yang Y, Santamaria P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. **Clin Sci (Lond)** 2006; 110:627-39.
31. Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. **Am J Ther** 2005; 12:580-91.
32. Zamora A, Matejuk A, Silverman M, et al. Inhibitory effects of incomplete Freund's adjuvant on experimental autoimmune encephalomyelitis. **Autoimmunity**. 2002; 35:21-8.