

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências

**Efeito da imunização com BCG no diabetes
experimental induzido por estreptozotocina**

Larissa Camargo da Rosa

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Co-orientador: Alexandre Domingues

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

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Rosa, Larissa Camargo da.

Efeito da imunização com BCG no diabetes experimental induzido por estreptozotocina / Larissa Camargo da Rosa. - Botucatu [s.n], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade Médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Alexandrina Sartori

Co-orientador: Alexandre Domingues

1. Diabetes - Aspectos imunológicos - Estudos experimentais 2.
Imunologia

Palavras-chave: Diabetes autoimune; BCG; Hipótese da higiene; Imunomodulação; Streptozotocina

“O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até o ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo. Isso é - ou deveria ser - a mais elevada forma de arte.”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho...

...e todas as horas que passei tornando-o algo concreto aos meus pais Cecília e Roberto, meu irmão André e minha avó Wilma.

Pelo apoio, não só nesse, mas em todos os momentos da minha vida.

Pela confiança que depositaram em mim e a liberdade que sempre me deram para traçar meu caminho profissional.

Por me ensinarem que a maior riqueza e o maior investimento que podemos fazer na vida é o estudo.

E, acima de tudo, pelo amor e o carinho infinitos que vocês têm por mim. É imensamente recíproco.

A pessoa que eu sou hoje é fruto de todos esses “ingredientes” que encontrei em casa. Amo vocês incondicionalmente!

Agradeço...

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre ter sido tão generoso e bom comigo, me presenteando com a vaga em uma ótima faculdade, uma experiência universitária inesquecível e o melhor ambiente de trabalho que alguém pode desejar.

À minha orientadora Alexandrina Sartori, por me acolher e me aceitar em sua equipe. Pelos numerosos ensinamentos no campo da Imunologia e, principalmente, no campo da pesquisa. Pelo exemplo de profissionalismo, ética e dedicação ao trabalho, que a tornam uma orientadora única. Obrigada também por aceitar me acompanhar durante esse novo desafio: o mestrado.

Ao Alexandre Domingues, meu co-orientador, pelo apoio, paciência e disponibilidade em sempre me ajudar a solucionar minhas dúvidas. Obrigada também pelo auxílio principalmente com relação à indução diabetes.

Às pessoas maravilhosas e extremamente competentes com quem eu divido o aprendizado diário que é tornar-se um pesquisador: Sofia, Fernanda, Thaís, Larissa (Dutra), Raphael (Panda) e David. Obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar e ensinar. Não consigo colocar em palavras o quanto aprendi com vocês! Obrigada pelos conselhos, as dicas e os momentos de descontração. Me sinto muito honrada em fazer parte desta equipe! “Um por todos e todos por um.”

À Karen (Kuentro), por ser meu anjo da guarda nos últimos quatro anos. À Mariana (Pip's), Marcos (Minu), Bruno (Pelanka), Renan (Kumbuka), Juliana (Kuby), Leila (Loka) e Rafael (Dori), Larissa (Mams), além do Panda e Dutra que já listei acima. Pessoas desconhecidas se transformaram em meus colegas. Esses colegas se tornaram importantes pra mim também fora da sala de aula e eu os chamei de meus amigos. Meus amigos se tornaram indispensáveis, uma parte enorme de mim que eu não posso viver sem. E já não havia mais nenhum outro jeito de chamá-los, senão de IRMÃOS! Obrigada pela amizade, confiança, pelas piadas e os puxões de orelha, as palavras de incentivo e o ombro amigo. Não existe um momento memorável nos últimos quatro anos em que vocês não estivessem comigo.

Agradecimentos

Aos meus primos e amigos de São Bento, meu elo com a infância. Taty, Rafa, Cynthia, Mary, Lipe, Vi, Gui, Digo, Polly...porque mesmo com a distância, eu sempre soube que podia contar com cada um. Antes de vir pra cá eu escrevi: “Amo vocês porque nunca me abandonam. A companhia de vocês me faz rir e é a falta de vocês que vai me fazer chorar...”. Mantenho cada palavra e cada vírgula!

Aos meus familiares por todo o apoio, especialmente Tio Edílson e Tia Andréia, pelos conselhos decisivos na decisão do meu futuro.

À Família ERBM/ENBM, por serem simplesmente...uma família! Cada um, com sua característica própria, me ensinou algo que vou levar pro resto da vida. A experiência de ser responsável e zelar por algo tão grandioso e valioso não pode ser encontrada nos livros e na sala de aula!

Aos funcionários e professores do Departamento de Microbiologia/Imunologia. Por todo o suporte e ajuda direta ou indiretamente.

À Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, pela gentileza em ceder as vacinas de BCG para meu trabalho.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

E a todos que, de alguma forma, me ajudaram a subir cada degrau que este trabalho representou em minha vida.

“I’m glad I share this with you!”

No Worries-McFLY

Resumo

O Bacilo de Calmette e Guérin (BCG) é utilizado em muitos países como profilaxia contra a tuberculose. Tem sido sugerido que esta vacina possa determinar, através de atividade imunomoduladora, proteção também contra outras patologias como alergia e doenças autoimunes. Entretanto, este assunto é ainda bastante controverso. A proposta desta investigação foi avaliar o efeito da imunização prévia com BCG no desenvolvimento do diabetes experimental do tipo I em camundongos C57BL/6. Para isto foram realizados três protocolos objetivando caracterizar a resposta imune desencadeada por BCG, padronizar o diabetes experimental tipo I e avaliar o efeito do BCG neste modelo de diabetes.

A imunização desta cepa de camundongos com BCG determinou produção discreta de IFN- γ mas produção significativa de IL-10 após estímulo *in vitro* das culturas com hsp65 recombinante (rhsp65). Os ensaios de padronização indicaram que o protocolo de inoculação de streptozotocina adotado determinou um quadro de diabetes típico caracterizado por glicemia elevada e graus variáveis de insulite. A imunização com BCG antes da indução do diabetes não alterou de forma significativa o peso, os níveis glicêmicos e a intensidade do processo inflamatório.

Os resultados obtidos sugerem que nas condições experimentais adotadas, o BCG não alterou o desenvolvimento do diabetes tipo I induzido por STZ em camundongos C57BL/6.

Palavras-chave: diabetes autoimune, streptozotocina, BCG, hipótese da higiene, imunomodulação.

Sumário

| | |
|---|--|
| Resumo | |
| 1. Introdução | |
| 1.1 Autoimunidade..... | |
| 1.2 Imunopatogênese do diabetes autoimune tipo I..... | |
| 1.3 Modelos experimentais de diabetes..... | |
| 1.4 Hipótese da Higiene..... | |
| 1.5 Modulação da resposta imune pelo BCG..... | |
| 2. Objetivos | |
| 2.1 Objetivo geral..... | |
| 2.2 Objetivos específicos..... | |
| 3. Material e Métodos | |
| 3.1 Animais..... | |
| 3.2 Imunização com BCG..... | |
| 3.3 Indução de diabetes por Streptozotocina..... | |
| 3.4 Determinação da glicemia..... | |
| 3.5 Análise histopatológica do pâncreas..... | |
| 3.6 Obtenção de soros e sobrenadantes de culturas..... | |
| 3.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas..... | |
| 3.8 Análise estatística..... | |
| 4. Protocolos Experimentais e Resultados | |
| 4.1 Protocolo Experimental I..... | |
| 4.1.1 Resultados Protocolo I..... | |
| 4.2 Protocolo Experimental II..... | |
| 4.2.1 Resultados Protocolo II..... | |

| | |
|---|--|
| 4.3 Protocolo Experimental III..... | |
| 4.3.1 Resultados Protocolo III..... | |
| A. Avaliação do peso corporal..... | |
| B. Avaliação dos níveis glicêmicos..... | |
| C. Análise histopatológica do pâncreas..... | |
| D. Avaliação da produção de citocinas..... | |
| 5. Discussão..... | |
| 6. Referências Bibliográficas..... | |

1. Introdução

1.1 Autoimunidade

O sistema imunológico protege o organismo através do reconhecimento dos agentes estranhos. Um evento fundamental neste processo é 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. Neste contexto, o fenômeno da autoimunidade ocorre quando o sistema imunológico falha em reconhecer seus componentes próprios e monta uma resposta imune contra os mesmos, desencadeando lesão celular e/ou tecidual.

A etiologia e a patogênese das doenças autoimunes é muito estudada, mas até o momento, só foram elucidadas parcialmente. Sabe-se que tanto fatores genéticos quanto ambientais contribuem para seu aparecimento. A associação entre genes do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) e as doenças autoimunes é classicamente reconhecida e foi revisada recentemente. Outros genes localizados fora do CPH também contribuem para o aparecimento de patologias autoimunes como é o caso daqueles que codificam CTLA-4, Foxp3, LYP e TNF (Fernando et al., 2008).

A contribuição do meio ambiente para o desenvolvimento e/ou gravidade destas patologias é complexo e pode se manifestar tanto sob a forma de um efeito deletério, quanto protetor. Por exemplo, algumas doenças autoimunes podem surgir após infecções com patógenos, os quais possuem proteínas com reatividade cruzada com epítomos do hospedeiro (Kohm et al., 2003). Além disto, um patógeno pode, por causar dano tecidual, liberar e expor certas proteínas do hospedeiro, as quais estão normalmente seqüestradas, quebrando desta forma os mecanismos de auto-tolerância (Horwitz et al., 2002). Por outro lado, evidências epidemiológicas e experimentais descritas nos últimos anos indicam que certos agentes infecciosos podem evitar ou diminuir a gravidade de algumas doenças autoimunes. Esta possibilidade tem sido discutida como Hipótese da Higiene e será abordada posteriormente na introdução desta monografia. O diabetes experimental foi o modelo de doença autoimune utilizado nesta proposta e por isto suas características gerais serão discutidas a seguir.

1.2 Imunopatogênese do diabetes autoimune tipo I

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, sede e aumento da produção urinária. 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: macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B autorreativos.

Existe concordância geral na literatura de que as células T são as mais relevantes no processo autoimune que ocorre no diabetes. Entre os vários autoantígenos identificados como alvo de células T diabetogênicas destacam-se: insulina, antígeno associado ao insulinoma (IA-2), descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e a proteína de choque térmico (hsp60) (Jasinski & Eisenbarth, 2005, Liu et al., 2007). Uma visão geral deste processo está esquematizada na figura 1. O diabetes tipo 1 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 3 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 possível contribuição das células B nesta patologia vem sendo investigada (Mariño & Grey, 2008).

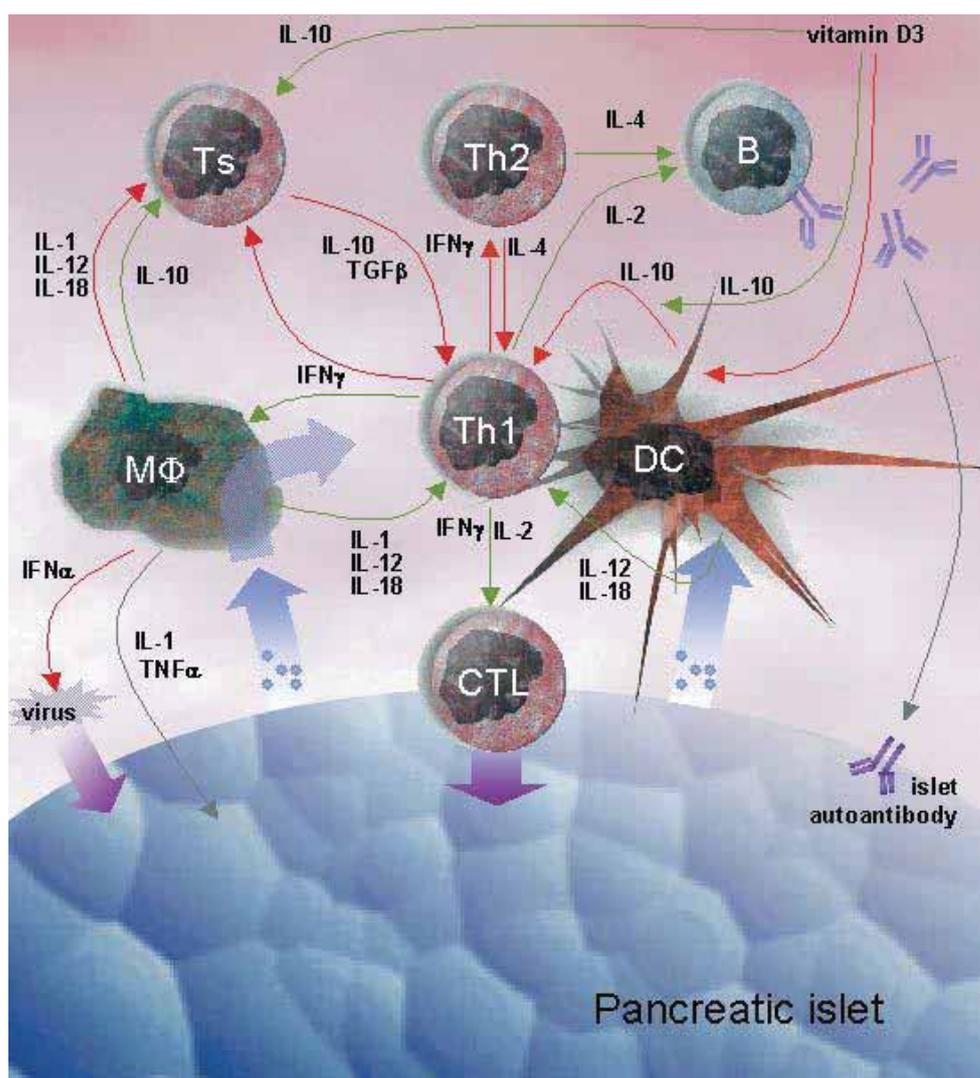


Figura 1: Imunopatogênese do diabetes tipo 1 (Roep, 2003).

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

figura 1 também podem ser observadas duas subpopulações celulares com funções imunorreguladoras bem conhecidas como é o caso das células Th₂ e T reguladoras (ou T supressoras). O conhecimento destas complexas interações celulares vem permitindo estratégias de imunointervenção tanto no sentido profilático quanto terapêutico.

1.3 Modelos experimentais de diabetes

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 inoculação de STZ, apesar de algumas limitações e críticas, é considerada um bom modelo para o estudo do diabetes mellitus, sendo que camundongos machos da linhagem C57BL/6 são os mais empregados (Like & Rossini, 1976).

A 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). Uma única dose elevada de STZ pode desencadear diabetes em roedores, provavelmente por resultar em efeito tóxico direto. Alternativamente, aplicando-se várias doses pequenas (40mg/kg) durante 5 dias consecutivos (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).

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 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).

1.4 Hipótese da Higiene

A incidência de várias doenças inflamatórias crônicas tais como rinite, diabetes tipo I, esclerose múltipla e doenças inflamatórias do intestino têm aumentado de forma significativa em países desenvolvidos (Bach, 2002; Sawczenko et al., 2001). Pelo menos parcialmente a razão deste aumento tem sido atribuída a uma menor exposição destas populações a determinados organismos, também chamados *old friends* que fizeram parte da história evolutiva dos mamíferos. Esta menor exposição comprometeria a ativação de vias imunorreguladoras desencadeando, portanto, as patologias inflamatórias. Esta possibilidade tem sido denominada Hipótese da Higiene. Duas categorias principais de microrganismos têm sido implicadas nesta teoria: 1) micobactérias e lactobacilos saprófitas presentes na lama, água não tratada e resíduos vegetais em fermentação; e 2) helmintos, os quais estão presentes ainda em abundância nos países em desenvolvimento mas não nos desenvolvidos. Os mecanismos pelos quais estes microrganismos pré-sensibilizam os hospedeiros, no sentido de ativar vias imunorregulatórias vêm sendo esclarecidos. De forma bastante sucinta, se acredita que estes microrganismos ativam vias imunológicas, que culminam com o aparecimento de células T regulatórias (Tregs) ao invés das clássicas células Th₁ ou Th₂ efetoras que seriam destinadas a eliminar os microrganismos (Rook, 2007). A indução destas células Tregs ocorreria porque estes organismos causariam um padrão diferencial de maturação de células dendríticas que determinaria diferenciação de T para Tregs mas não para Th₁ e Th₂ (Adams et al., 2004; Smits et al., 2005 e van der Kleij et al., 2002). Este ambiente regulador, por sua vez, controlaria processos inflamatórios através de 2 mecanismos distintos. No primeiro caso, a presença constante dos microrganismos determinaria uma ativação continuada de células Tregs, o que causaria um *background* supressor. No segundo, estas CD (determinadas células dendríticas reguladoras – CDregs)

também processariam antígenos próprios, antígenos oriundos do intestino ou alérgenos, induzindo desta forma, células Tregs capazes de controlar processos inflamatórios relacionados com a autoimunidade, doenças inflamatórias do intestino e alergia (Rook, 2007). As vias pelas quais CDregs e Tregs bloqueiam ou finalizam o processo inflamatório não estão completamente elucidados, mas acredita-se que incluam a participação das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β (Taylor et al., 2006; Wilson et al., 2005). A validade desta hipótese tem recebido um significativo suporte não só de modelos experimentais como também de ensaios clínicos, nos quais o contato com estes tipos de microrganismos tem sido utilizado para controlar alergia (Ricklin Gutzwiller et al., 2007), inflamação intestinal (Di Giacinto et al., 2005) e processos autoimunes (Zaccone et al., 2003).

1.5 Modulação da resposta imune pelo BCG

O Bacilo Calmette – Guérin (BCG) é uma cepa não patogênica de *Mycobacterium bovis* que tem sido, desde 1920, utilizada como profilaxia para a tuberculose. A vacinação com BCG estimula os macrófagos, os quais induzem a ativação e liberação de citocinas, em especial de IFN- γ por células Th₁. A presença do IFN- γ juntamente com seu efeito inibidor sobre células Th₂ determina a predominância de um padrão Th₁. Isto tem servido, pelo menos parcialmente, como base para o uso de BCG na terapia de tumores e no controle de processos alérgicos. Modelos animais têm permitido demonstrar que a imunização com BCG diminui a polarização no sentido Th₂ através de inibição de IL-4 e IL-5, IgE e IgG1 (Tukenmez et al., 1999)

Parte deste efeito protetor do BCG contra alergia e asma tem sido atribuído à sua capacidade de estimular a produção de elevados níveis de IL-10 (Akdis et al., 1998). A possibilidade de que esta IL-10 seja produzida por células Tregs tem sido sugerida pela presença de um número aumentado destas células em pacientes com tuberculose e pelo aumento concomitante dos níveis de IL-10 e TGF- β nestes indivíduos (Guyot-Revol et al., 2006).

A imunização com BCG também pode determinar efeitos protetores sobre doenças autoimunes experimentais, tais como encefalite e diabetes tipo I. A princípio, isto poderia

parecer difícil de conciliar com o fato destas patologias serem mediadas especialmente por células Th₁. Entretanto, relatos recentes obtidos com modelos experimentais descrevem que este efeito protetor está vinculado à destruição de células T diabetogênicas e encefalitogênicas por apoptose mediada por IFN- γ e TNF- α (Qin et al., 2004; O'Connor et al., 2005). Este efeito protetor tem sido mais observado em modelos experimentais de doenças espontâneas nos quais camundongos NOD ou ratos BB são protegidos contra insulite e hiperglicemia através de inoculação com Adjuvante Completo de Freund ou imunização com BCG (McInerney et al., 1991; Sadelain et al., 1990; Sadelain et al., 1990; Qin et al., 1997; Harada et al., 1990)

Por outro lado, estudos epidemiológicos conduzidos em populações humanas submetidas a imunização com BCG são menos consistentes, sendo que alguns sugerem proteção, outros ausência de associação e até mesmo um risco maior para o desenvolvimento de patologia autoimune (Parent et al., 1997; Huppmann et al., 2005; Sanjeevi et al., 2002).

Dentro deste contexto, nossa proposta de trabalho é investigar o efeito da imunização prévia com BCG no desenvolvimento do diabetes experimental do tipo I.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da imunização prévia com BCG no desenvolvimento do diabetes experimental tipo I.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar a resposta imune (humoral e celular) induzida pelo BCG.
- 2) Padronizar o diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) em camundongos C57BL/6.
- 3) Avaliar o efeito da imunização prévia com BCG no desenvolvimento do diabetes experimental induzido por STZ em camundongos C57BL/6.

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 86/08-CEEA). Estes receberam ração comercial Nuvilab CR-1 (NUVITAL, PR) e água filtrada *ad libitum*. Foram acondicionados em caixas de propileno com maravalha 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 aclimatados durante 1 semana antes do experimento.

3.2 Imunização com BCG

Os animais foram imunizados com uma única dose de BCG (50 μL por animal), por via subcutânea na base da cauda. Esta vacina é produzida pela Fundação Ataulpho de Paiva e foi fornecida pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Em função da concentração existente em cada ampola, que é de $2 \cdot 10^6$ bacilos vivos, acredita-se que cada animal tenha recebido e torno de $2,5 \cdot 10^5$ bactérias. Animais imunizados com BCG foram utilizados nos protocolos I e III.

3.3 Indução de diabetes por Streptozotocina

Os camundongos foram tratados com 5 doses de STZ (0,1mL) por via intra-peritoneal (dias 0-5) na concentração 40 mg/kg de peso corpóreo/dia. A droga 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; o pH ideal é de 4,5. A solução de STZ já preparada foi coberta por papel alumínio e a droga foi sempre mantida em temperatura -

20°C, para evitar degradação. Os animais foram submetidos a jejum de 4-6 horas antes das inoculações.

3.4 Determinação da glicemia

A progressão do diabetes foi determinada pelo nível da glicose sanguínea (Glicosímetro Prestige Smart System). Níveis sanguíneos superiores a 200 mg/dl indicaram diagnóstico de diabetes. A coleta de sangue foi feita uma vez por semana, no período da manhã, através de punção retro-orbital.

3.5 Análise histopatológica do pâncreas

Esta análise foi executada nos protocolos II e III. No segundo protocolo, a eutanásia foi realizada nos dias 9, 16, 23 e 30 após a quinta injeção de STZ. Em cada um desses períodos, foram eutanasiados dois animais do grupo controle e dois do grupo STZ para a posterior avaliação histológica do pâncreas. No Protocolo Experimental III, a eutanásia e retirada do pâncreas foram realizadas no 21º dia após a última injeção de STZ. O pâncreas foi coletado 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 5µm 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 análise histológica do pâncreas, 10 ilhotas por lâmina foram analisadas e um sistema de *score* adotado para sua classificação: Grau 0 (ausência de infiltrado mononuclear), Grau 1 (infiltrado mononuclear pontual na periferia da ilhota), Grau 2 (infiltrado mononuclear moderado e 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).

3.6 Obtenção de soros e sobrenadantes de culturas

Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca. Sobrenadantes de culturas de células esplênicas foram obtidos segundo a metodologia descrita a seguir. 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 ConA (10 µg/mL) ou rhsp65 (10µg/mL). 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.

3.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas

Placas de poliestireno (Nunc) de 96 poços foram recobertas com 100 µg/poço de solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IFN- γ , IL-5 e IL-10 de camundongo, na concentração de 1µg/mL, diluído em tampão fosfato de sódio (pH 9.0). As placas foram incubadas a 4 °C, overnight. Após cinco lavagens com solução PBS – Tween 20 (0.05%), foi adicionada 200 µg/poço da solução de bloqueio, constituída de PBS – Tween com 10% de soro bovino fetal, com incubação por 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas overnight, a 4 °C, com as amostras e com a curva do padrão da citocina diluídas na base dois em tampão PBS contendo 10% soro bovino fetal e 0.05% de Tween 20. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo anti-citocina biotilado, nas concentrações de 1µg/mL (IL-10 e IL-5) e 0,5µg/mL (IFN- γ) em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0.05% de Tween 20, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram incubadas com a solução AB (estreptoavidina + peroxidase) durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação revelada com o substrato H₂O₂ 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.

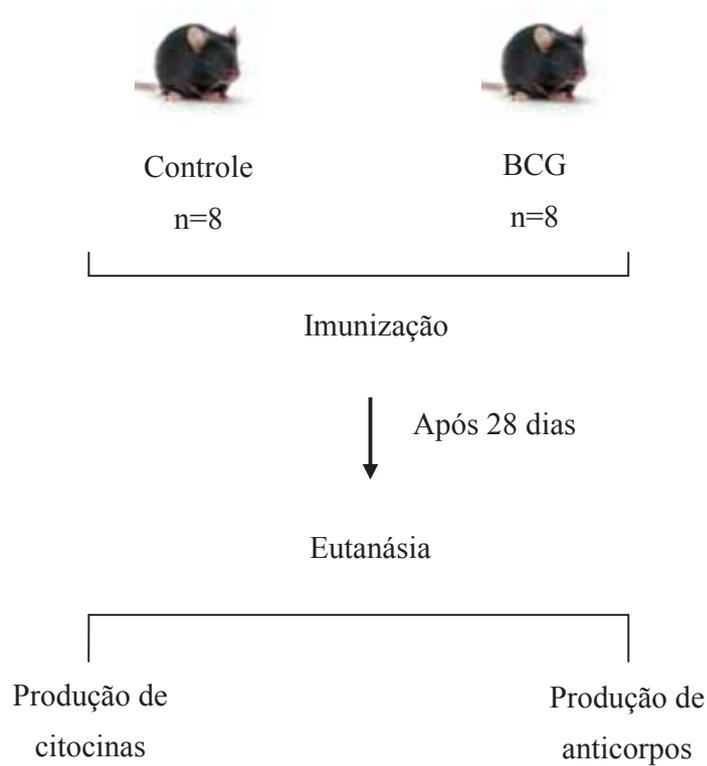
3.8 Análise estatística

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste t de Student. Para as variáveis não paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartilício e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. 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

4.1 Protocolo Experimental I

Objetivo: Avaliar a resposta imune induzida pelo BCG em camundongos C57BL/6.



4.1.1 Resultados Protocolo I

A resposta imune celular foi avaliada através das dosagens de IFN- γ , IL-5 e IL-10 em culturas de células esplênicas e de linfonodos regionais estimuladas com rhsp65 e Concanavalina A (ConA). Os dados identificados como “meio” referem-se às culturas nas quais não se adicionou estímulo e sim só meio de cultura.

O estímulo com a proteína rhsp65 induziu produção mais elevada de IFN- γ pelas células esplênicas dos animais imunizados com BCG (figura 2a). Entretanto, a diferença observada em comparação com o grupo não imunizado não foi estatisticamente significativa.

Culturas esplênicas de animais imunizados estimuladas com ConA produziram também níveis mais elevados de IFN- γ , embora sem diferença estatística, em comparação com culturas de animais normais estimulados da mesma forma (figura 2b).

Nas culturas de células de linfonodo (inguinais + poplíteos) estimuladas com rhsp65 não detectamos produção de IFN- γ (dados não mostrados). Quando estimuladas com ConA, as culturas dos animais imunizados produziram níveis de IFN- γ discretamente mais elevados do que o controle (figura 2c).

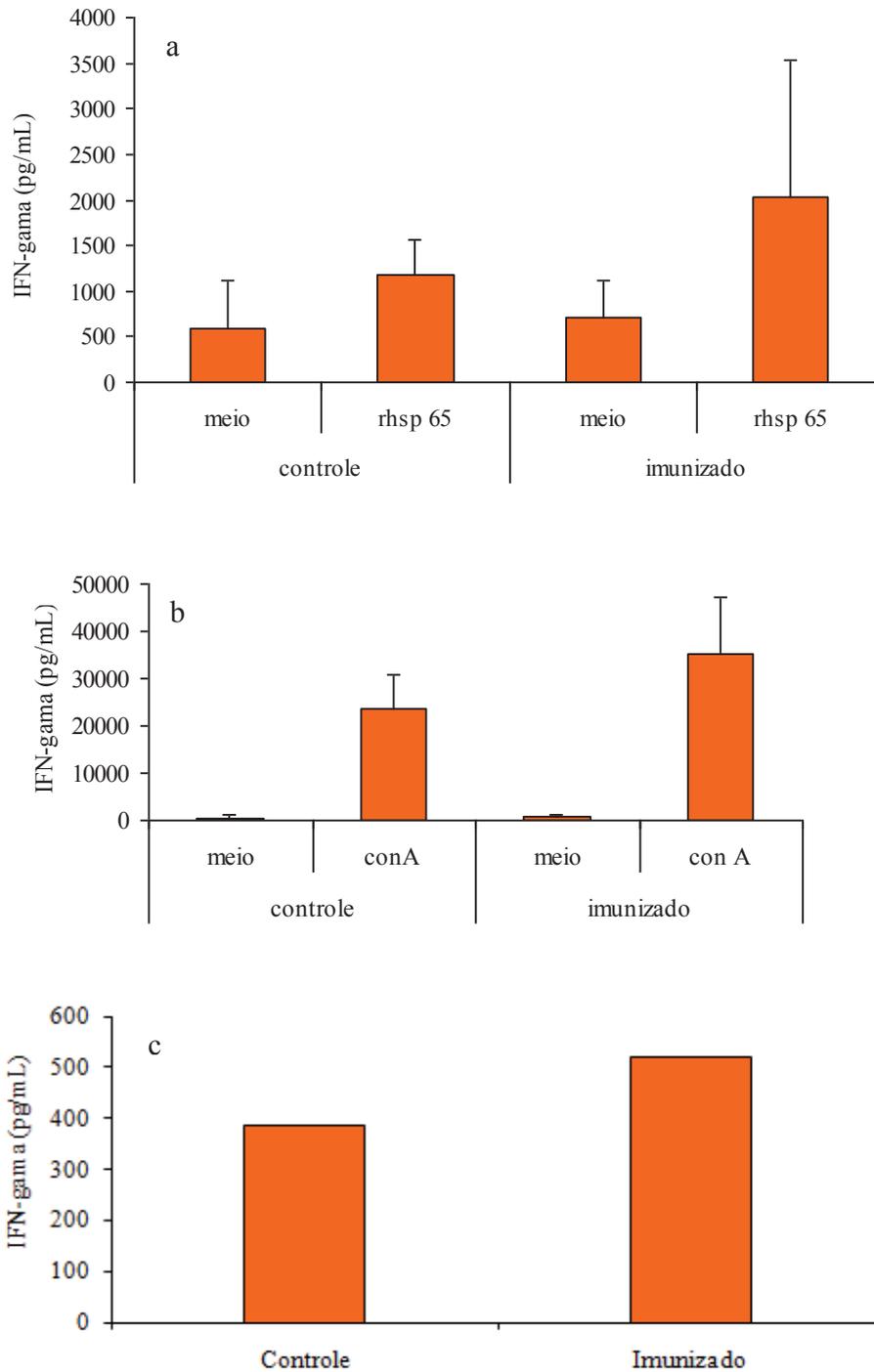


Figura 2 – Produção de IFN- γ em camundongos C57BL/6 imunizados com BCG. As células esplênicas foram estimuladas com hsp65 (a) e ConA (b) e os linfonodos foram estimulados *in vitro* com ConA (c). Os resultados representam a média + desvio padrão de 8 animais por grupo.

A IL-5 foi detectada em culturas de linfonodos estimulados com rhsp65 (figura 3a) e nas culturas de células esplênicas estimuladas com ConA (figura 3b). Nestes casos, não detectamos diferenças estatísticas entre os grupos controle e imunizado.

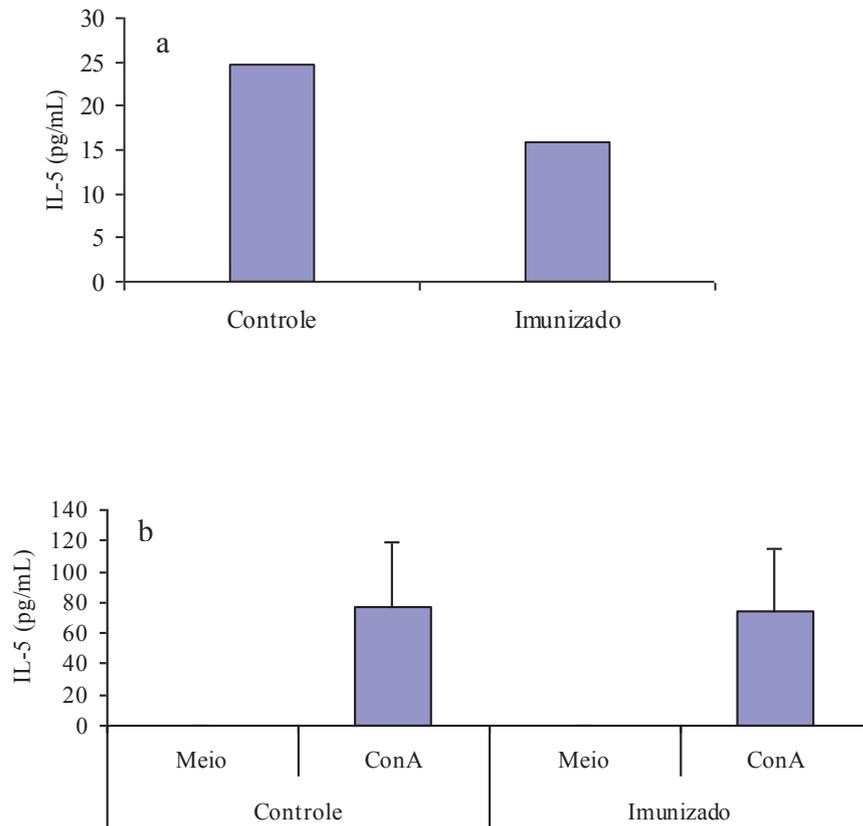


Figura 3 - Produção de IL-5 em camundongos C57BL/6 imunizados com BCG. Células de linfonodos estimulados com a proteína rhsp65 (a) e células esplênicas foram estimuladas com ConA (b). Os resultados representam a média + desvio padrão de 8 animais por grupo.

Em relação à produção de IL-10, células esplênicas de animais imunizados estimuladas *in vitro* com rhsp65 produziram níveis significativamente elevados desta citocina em comparação com os animais do grupo controle (figura 4a). Após estímulo com ConA, tanto as culturas esplênicas dos animais normais quanto dos imunizados produziram níveis elevados desta citocina, mas sem diferença estatística, entre os mesmos (figura 4b). Não detectamos IL-10 nas culturas de linfonodos.

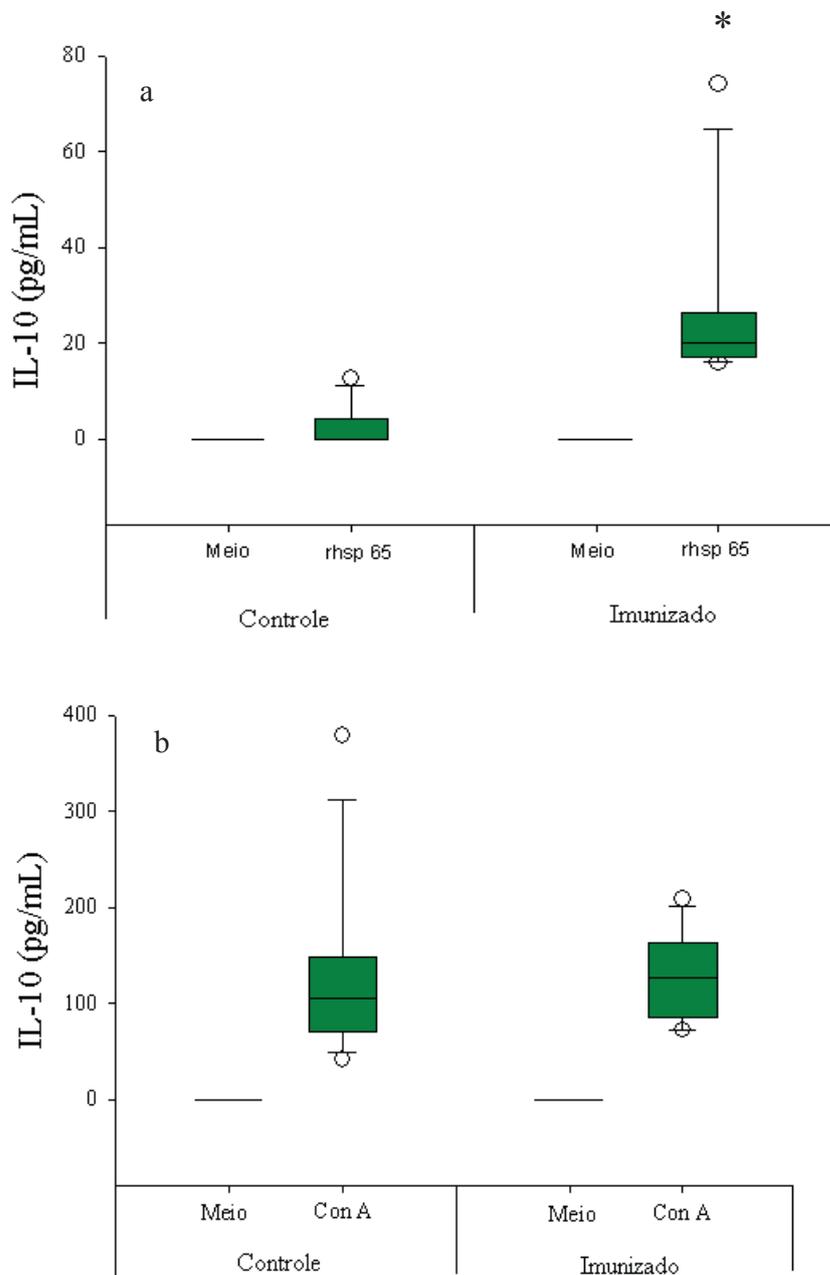


Figura 4 - Produção de IL-10 em camundongos C57BL/6 imunizados com BCG. As células esplênicas foram estimuladas com a proteína rhsp65 (a) e ConA (b). Os resultados apresentados representam a mediana (25 – 75%) de 8 animais por grupo. * $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle.

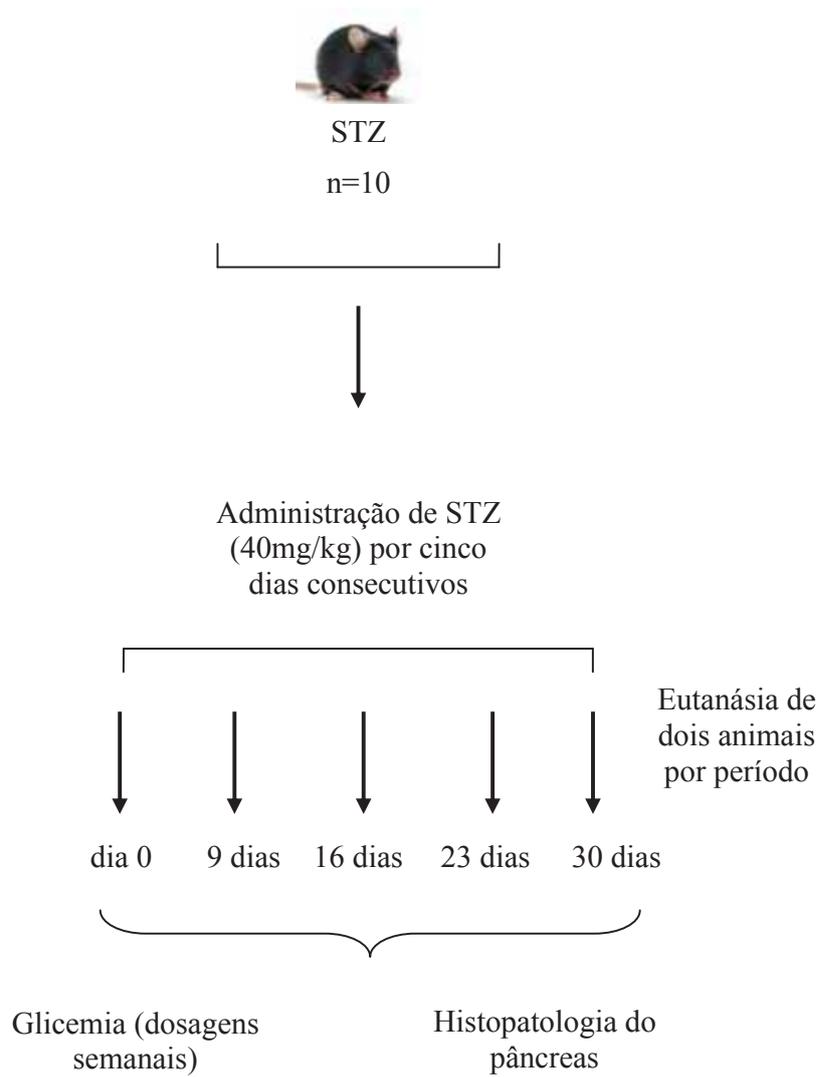
Até o momento não obtivemos sucesso na detecção de anticorpos específicos para o BCG. Foram realizados diversos ELISAs nos quais variamos o antígeno solúvel utilizado pra o *coating*. Neste sentido, foram testadas: 1) rhsp65 (5 µg/mL); 2) PPD humano (0,04 e 0,2 µg/mL); 3) PPD bovino (2, 5, 10 e 50µg/mL).

No caso do PPD bovino, mesmo com as concentrações mais baixas do antígeno, o background foi muito elevado.

No momento estamos preparando antígeno solúvel derivado do próprio BCG para uso como estímulo em culturas celulares e como antígeno para detecção de anticorpos específicos.

4.2 Protocolo Experimental II

Objetivo: Padronizar o diabetes induzido por STZ em camundongos C57BL/6.



4.2.1 Resultados Protocolo II

Este protocolo tinha por objetivo investigar qual seria o melhor período para avaliar as alterações glicêmicas e histopatológicas causadas pela STZ. Para isto, fizemos uma análise histopatológica seriada nos dias 0, 9, 16, 23 e 30 após a última dose da droga.

Os animais tratados com MLD-STZ 40 mg/kg começaram a apresentar diabetes clínico, com níveis glicêmicos superiores a 200 mg/dl, aos 9 dias. A elevação da glicemia ocorreu de forma gradual até 30 dias após a última dose de STZ, sendo significativamente superior aos observados no grupo controle negativo durante todo o período experimental ($p < 0,001$) (Tabela 1).

O infiltrado inflamatório mononuclear das ilhotas pancreáticas já foi observado no 9º dia após a última inoculação de STZ (Graus 1 e 2), aumentando em gravidade com o decorrer do tempo (Tabela 2). Aos 23 dias, 70,7% das ilhotas pancreáticas apresentaram insulite grau 3 e 29,3% insulite grau 2, acompanhada por alterações de sua arquitetura e apoptose de células β (Figura 5).

Tabela 1 – Níveis glicêmicos¹ em animais tratados com MLD-STZ

| Grupos | 0 ² | 9 dias | 16 dias | 23 dias | 30 dias |
|-------------------|----------------|--------|---------|---------|---------|
| Controle negativo | 86,6 | 76,2 | 88,8 | 73,3 | 88,8 |
| MLD-STZ | 94,6 | 251,6 | 295,3 | 289,5 | 327 |

¹Todos os valores são expressos como médias, ²Nível glicêmico antes da inoculação de STZ. (n) número de animais/período = 2.

Tabela 2 – Análise histológica do infiltrado mononuclear¹ nas ilhotas de camundongos C57BL/6 tratados com MLD-STZ.

| Período | Grau 0 | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 |
|---------|--------|--------|---------|---------|
| 9 dias | 0 | 60% | 40% | 0 |
| 16 dias | 0 | 25% | 48,125% | 26,875% |
| 23 dias | 0 | 0 | 29,3% | 70,7% |
| 30 dias | 0 | 25% | 50% | 25% |

¹ Valores expressos como porcentagem de ilhotas apresentando infiltrado mononuclear graus 0,1,2 ou 3; n = 2 animais/período

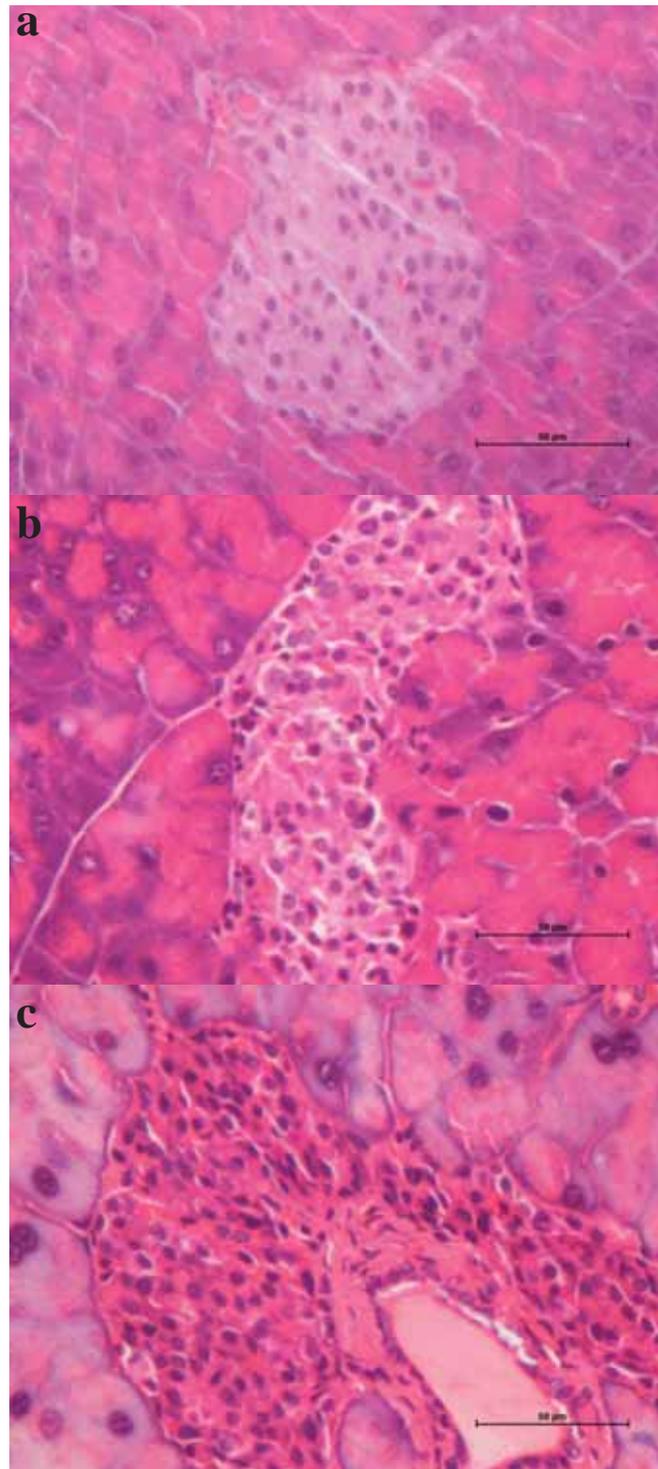
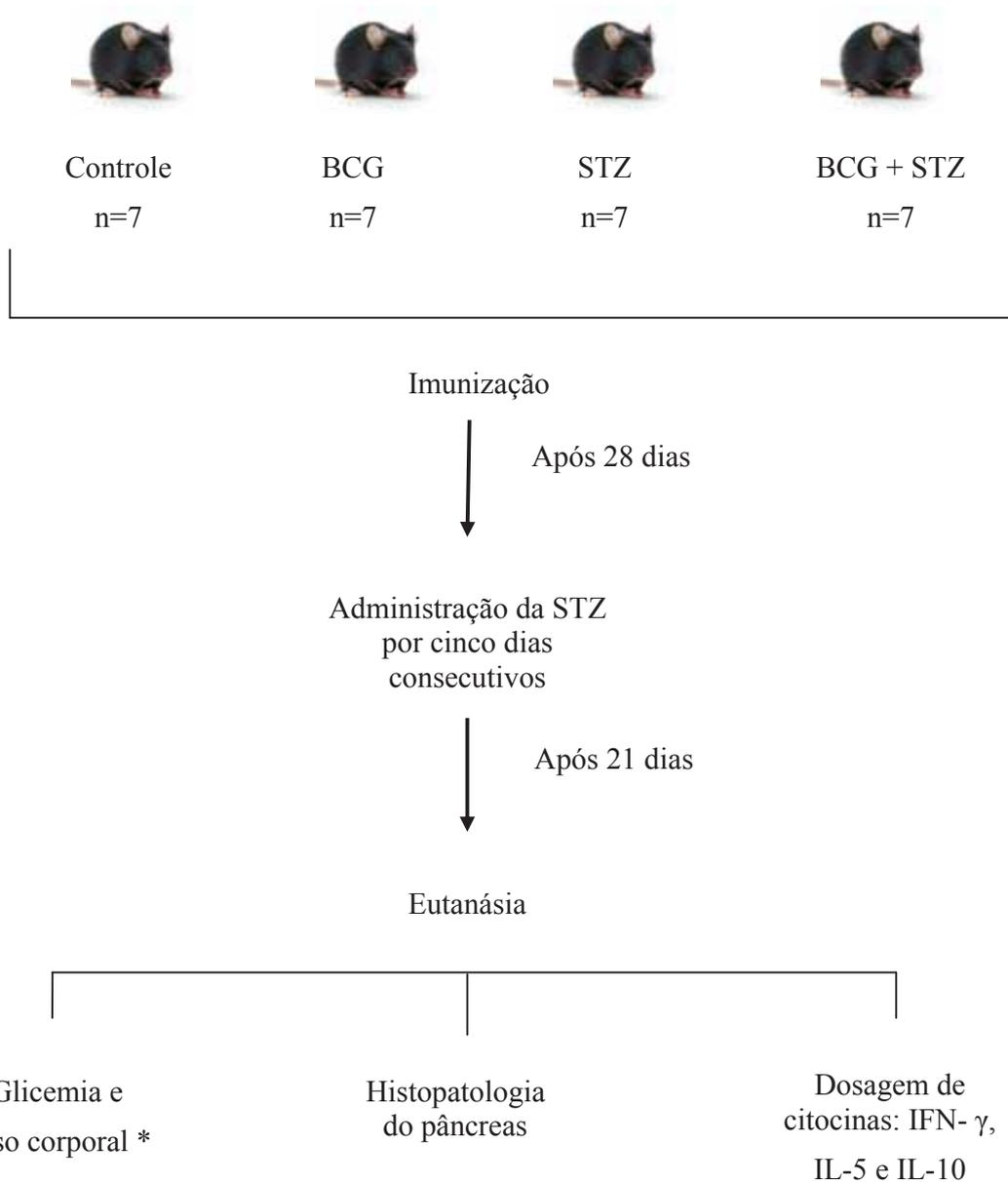


Figura 5 – Diferentes graus de insulite nas ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6 inoculados com STZ. Ilhota grau 0 em animais controle (a), ilhota grau 2 aos 23 dias após a última dose de STZ (b) e ilhota grau 3 aos 23 dias após a última dose de STZ (c). Aumento de 40x.

4.3 Protocolo Experimental III

Objetivo: Avaliar o efeito da imunização prévia com BCG no diabetes experimental induzido por STZ.



*A avaliação da glicemia e peso corpóreo dos animais foi feita uma vez semana, a partir da administração da STZ.

4.3.1 Resultados Protocolo III

A – Avaliação do peso corporal

Um dos indicadores da gravidade da doença no modelo MLD-STZ é a perda de peso corporal.

Na figura 6 pode-se observar a variação de peso dos animais entre os dias 0 (anterior ao período de indução do diabetes) e 21 (dia da eutanásia). Os animais do grupo STZ apresentaram uma perda de cerca de 1% do peso corpóreo, enquanto os animais do grupo BCG + STZ não apresentaram variação, entretanto essa diferença não foi significativa. Diferença significativa de peso ocorreu quando comparados o grupo BCG com os grupos que receberam STZ.

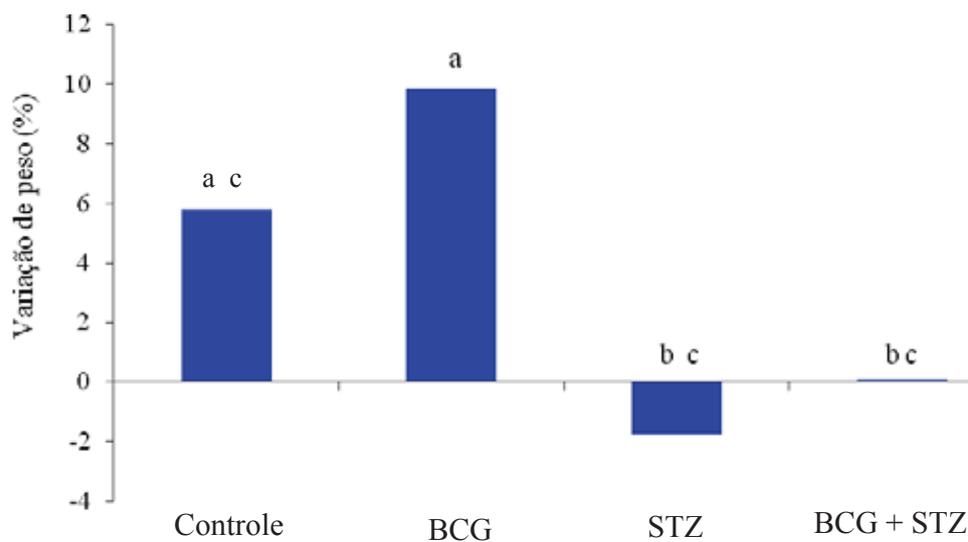


Figura 6: Variação de peso corpóreo dos animais 21 dias após a última injeção de STZ. A diferença estatística é dada pela presença de letras não coincidentes nas colunas a serem comparadas ($p= 0,003$).

B – Avaliação dos níveis glicêmicos

Na figura 7 é mostrada a evolução da glicemia durante o período experimental após a indução do diabetes.

No 5º dia após o último dia de indução, os animais do grupo STZ já apresentavam nível glicêmico acima dos 200mg/dl, caracterizando um estado diabético. Neste mesmo período, o nível glicêmico no grupo BCG + STZ já estava elevado, mas ainda abaixo de 200mg/dl). A partir do 13º dia de avaliação, os dois grupos (STZ e BCG + STZ) apresentaram glicemias semelhantes entre si, porém estatisticamente diferentes dos grupos Controle e BCG. Essa diferença estatística foi observada até o dia 21.

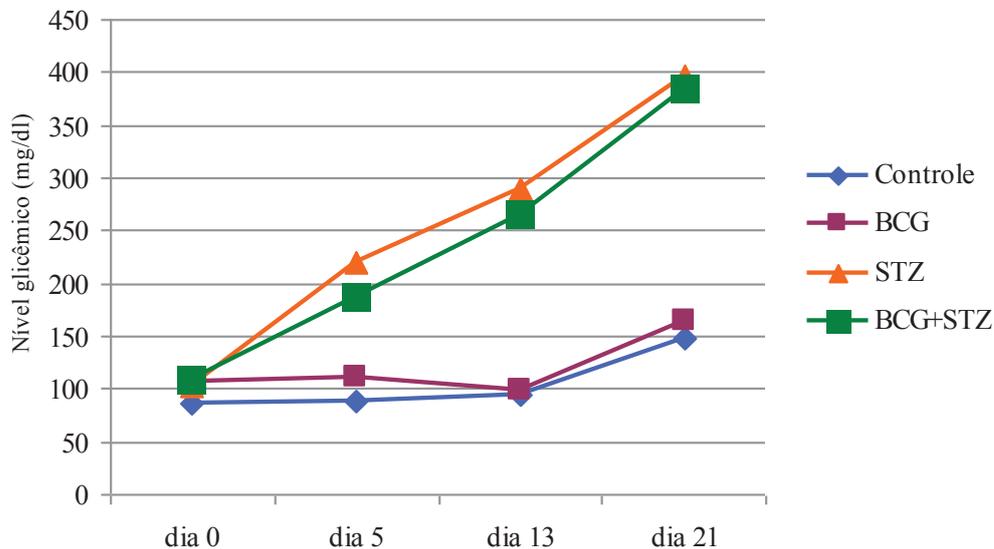


Figura 7: Evolução da glicemia após a indução com streptozotocina. Níveis glicêmicos acima de 200mg/dl são considerados evidência de diabetes.

A figura 8 mostra a variação de glicemia ocorrida entre os dias 0 e 21. Os animais dos grupos STZ e BCG + STZ apresentaram um aumento no valor de suas glicemias de 288% e 261%, respectivamente (não há diferença estatística entre eles). Nos grupos controles não diabéticos (controle e BCG) a variação foi menor, 76 e 53% e significativamente diferentes dos grupos STZ e BCG + STZ (mas não diferentes entre si).

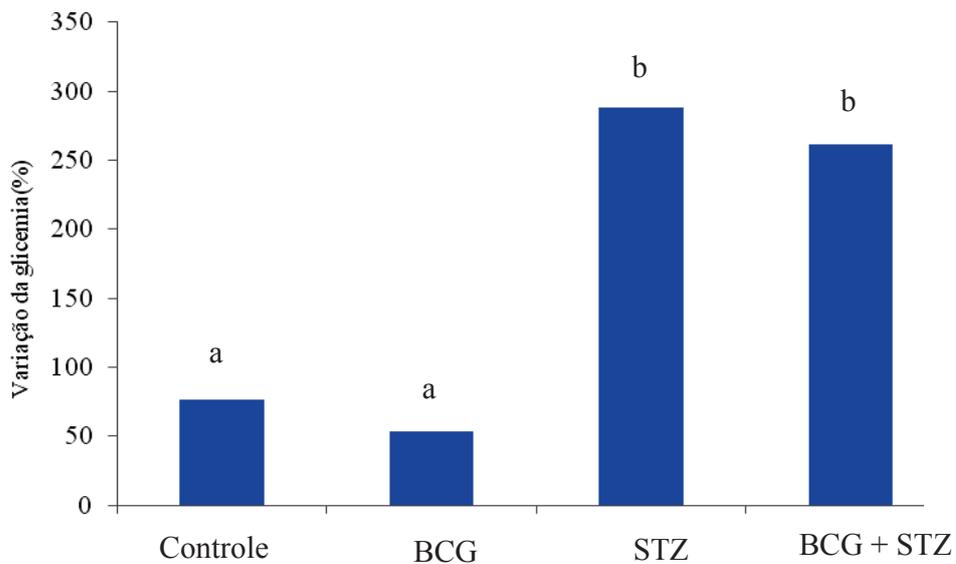


Figura 8: Variação de glicemia dos animais avaliada no 21º dia após a última injeção de STZ. A diferença estatística é indicada pela presença de letras não coincidentes nas colunas a serem comparadas ($p= 0,003$).

C – Análise histopatológica do pâncreas

Após a avaliação dos resultados do segundo protocolo, adotamos o 21º dia após a indução do diabetes como o dia ideal para avaliar o grau de inflamação

Os diferentes graus de insulite em animais dos grupos STZ e BCG + STZ são ilustrados nas figuras 9 e 10 respectivamente. A figura (9a) mostra grau zero, como esperado, no grupo controle. No grupo STZ foram encontrados todos os três graus possíveis de insulite: grau 1 (9b); grau 2 (9c) e grau 3 (9d).

Nos animais do grupo BCG + STZ foram observado tanto ilhotas sem infiltração como ilhotas contendo infiltrados inflamatórios grau 1, 2 e 3.

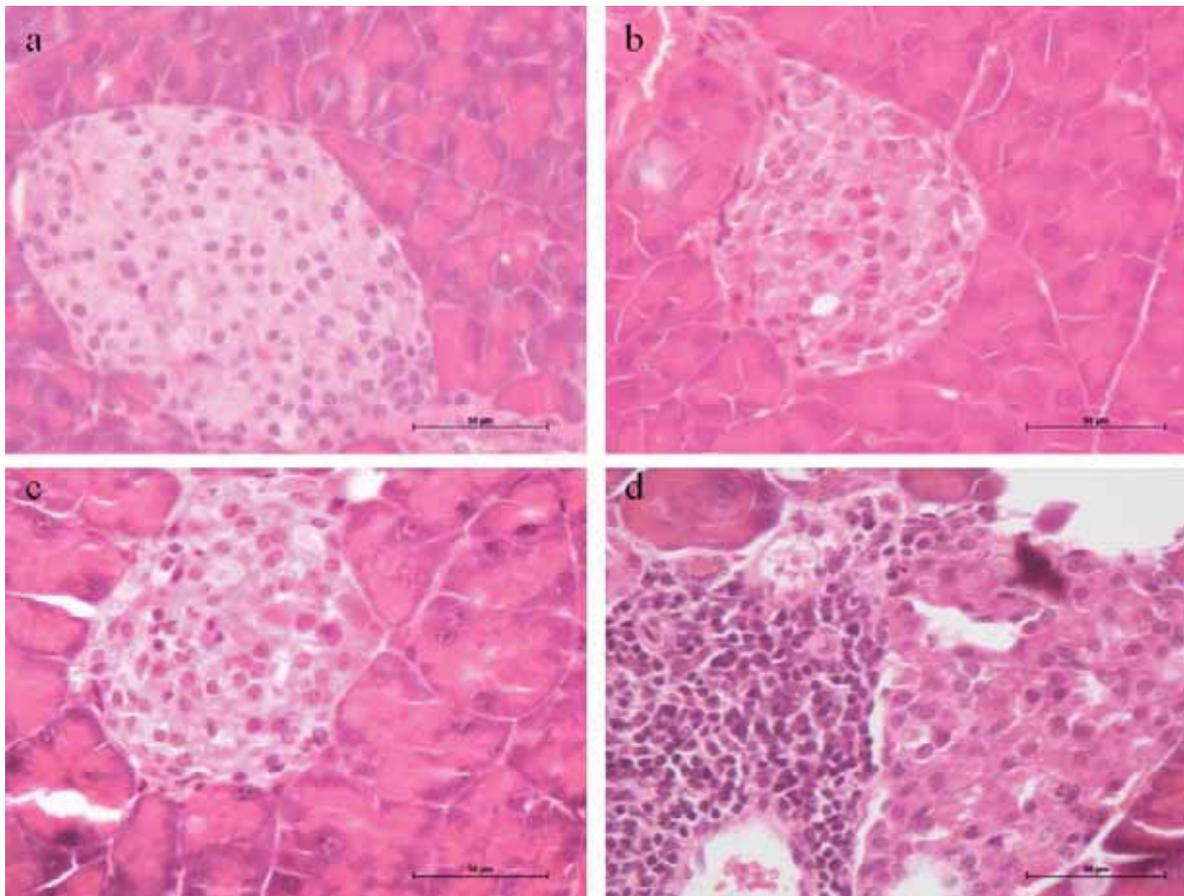


Figura 9 – Graus de insulite analisados em cortes histológicos de animais do grupo STZ e grupo controle. Ilhota do grupo controle, em grau 0 (a). Animais do grupo STZ: grau 1 (b), grau 2 (c) e grau 3 (d). Aumento de 40x.

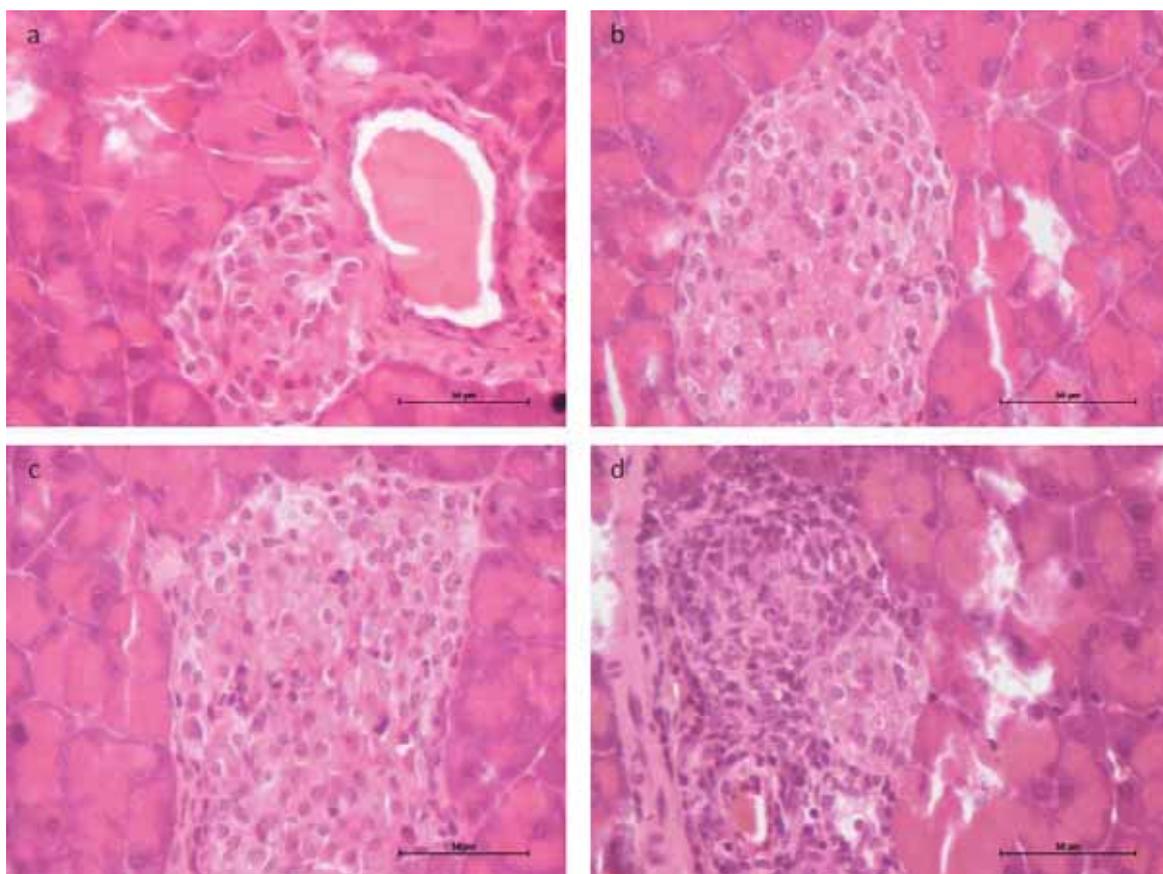


Figura 10 – Graus de insulite analisados em cortes histológicos de animais do grupo BCG + STZ. Ilhotas pancreáticas grau 0 (a), grau 1 (b), grau 2 (c) e grau 3 (c). Aumento de 40x.

Como se pode observar nesta tabela, somente os animais do grupo BCG + STZ possuíam ilhotas grau zero, ou seja, sem nenhum processo inflamatório. Além disto, este grupo também apresentou menor percentual de ilhotas com graus 1 e 2.

Entretanto, o grupo BCG + STZ apresentou uma porcentagem maior de ilhotas em grau 3 do que o grupo STZ.

Tabela 3: Graus de insulite por animal.

| STZ | Grau 0 | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1 | 0 | 70 | 30 | 0 |
| 2 | 0 | 80 | 10 | 10 |
| 3 | 0 | 50 | 40 | 10 |
| 4 | 0 | 60 | 10 | 30 |
| 5 | 0 | 30 | 30 | 40 |
| 6 | 0 | 80 | 10 | 10 |
| 7 | 0 | 40 | 40 | 20 |
| Média | 0 | 58,6 | 24,3 | 17,1 |

| BCG STZ | Grau 0 | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1 | 0 | 50 | 10 | 40 |
| 2 | 0 | 40 | 20 | 40 |
| 3 | 20 | 40 | 0 | 40 |
| 4 | 0 | 50 | 40 | 10 |
| 5 | 0 | 90 | 10 | 0 |
| 6 | 40 | 50 | 10 | 0 |
| 7 | 0 | 20 | 10 | 70 |
| Média | 8,5 | 48,6 | 14,3 | 28,6 |

Para cada animal foram avaliadas 10 ilhotas pancreáticas. Os valores são dados em porcentagem (%).

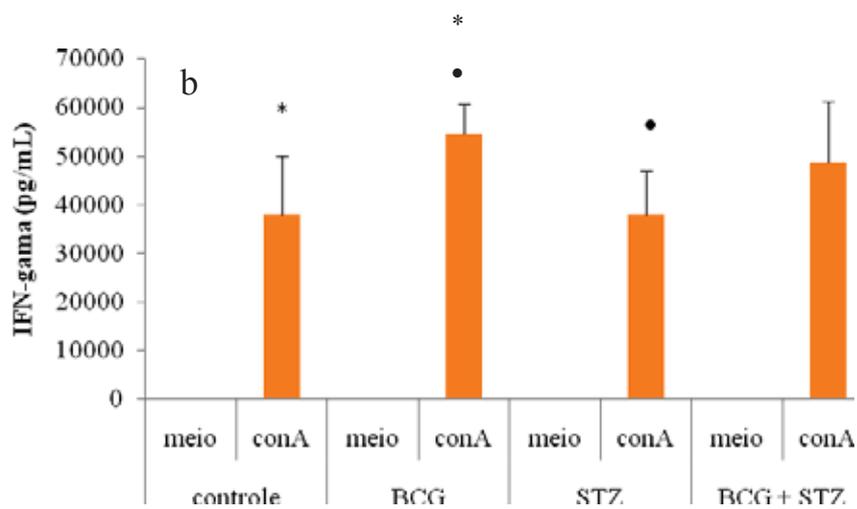
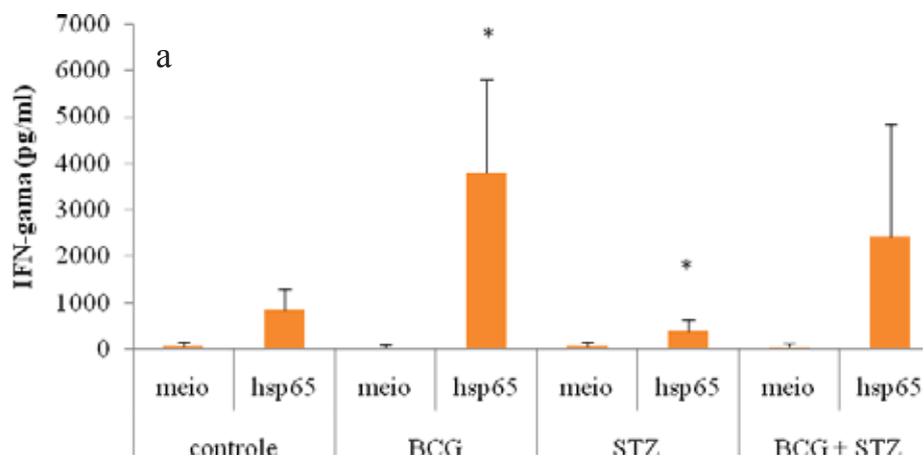
D – Avaliação da produção de citocinas

De forma similar ao primeiro protocolo, a resposta imune celular foi quantificada através das dosagens de IFN- γ , IL-5 e IL-10 em células de baço e linfonodo. A avaliação nos linfonodos foi feita nos sobrenadantes obtidos de um *pool* de linfonodos (inguinais e poplíteos) por grupo. As culturas foram estimuladas com hsp65 e ConA. Os dados identificados como “meio” referem-se a culturas controle, ou seja, sem adição de estímulo.

Nas culturas estimuladas com rhsp65 ocorreu maior produção de IFN- γ nos grupos BCG (diferença significativa em relação ao controle) e BCG + STZ (diferença não significativa em relação ao controle). Apesar do valor médio de IFN- γ ser menor no grupo BCG + STZ em relação ao grupo BCG, esta diferença não foi significativa (figura 11a).

Ocorreu diferença significativa de IFN- γ nas culturas de células esplênicas estimuladas com ConA dos quatro grupos experimentais. No caso das culturas oriundas do grupo BCG, os valores foram similares aos do grupos BCG + STZ. Entretanto, a produção de IFN- γ do grupo BCG foi significativamente mais elevada em comparação com os grupos controles e STZ (figura 11b).

A produção de IFN- γ por culturas de linfonodos mostrou um perfil similar ao observado no baço, ou seja, os grupos BCG e BCG + STZ produziram níveis elevados desta citocina após estímulo tanto com rhsp65 (figura 11c) quanto com ConA (figura 11d). A produção de IFN- γ também foi mais elevada no grupo BCG do que no grupo BCG + STZ.



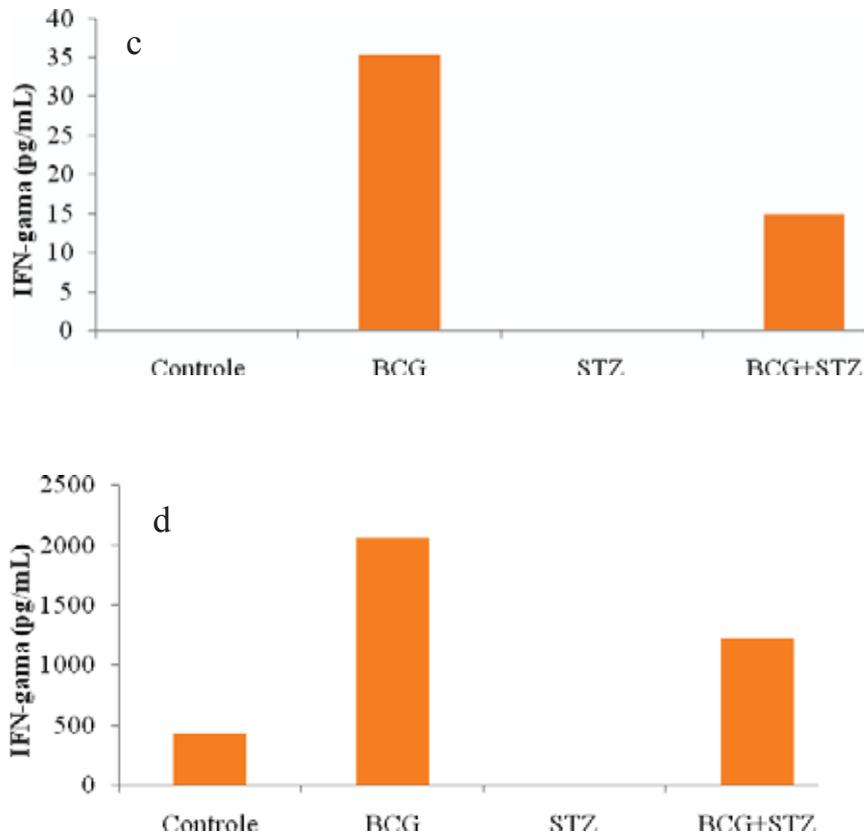


Figura 11 – Produção de IFN- γ em camundongos C57BL/6 imunizados com BCG e após a indução de diabetes. As culturas esplênicas foram estimuladas com rhsp65 (a) e ConA (b) e os linfonodos também foram estimulados com rhps65 (c) e ConA (d). Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 7 animais por grupo. Para a diferença estatística, foram usados dois sinais (* e ●), as colunas que apresentam símbolos iguais apresentam diferença estatística $p=0,012$.

Não ocorreu produção de IL-5 nas culturas esplênicas estimuladas com rhsp65 (dados não mostrados). Por outro lado, os quatro grupos produziram níveis significativos de IL-5 após estímulo com ConA (figura 12a). Apesar da produção desta citocina ter sido mais baixa no grupo BCG + STZ em comparação com o grupo BCG, esta diferença não foi significativa. Nos linfonodos ocorreu produção de IL-5 nas culturas estimuladas com ConA do grupo BCG (figura 12b).

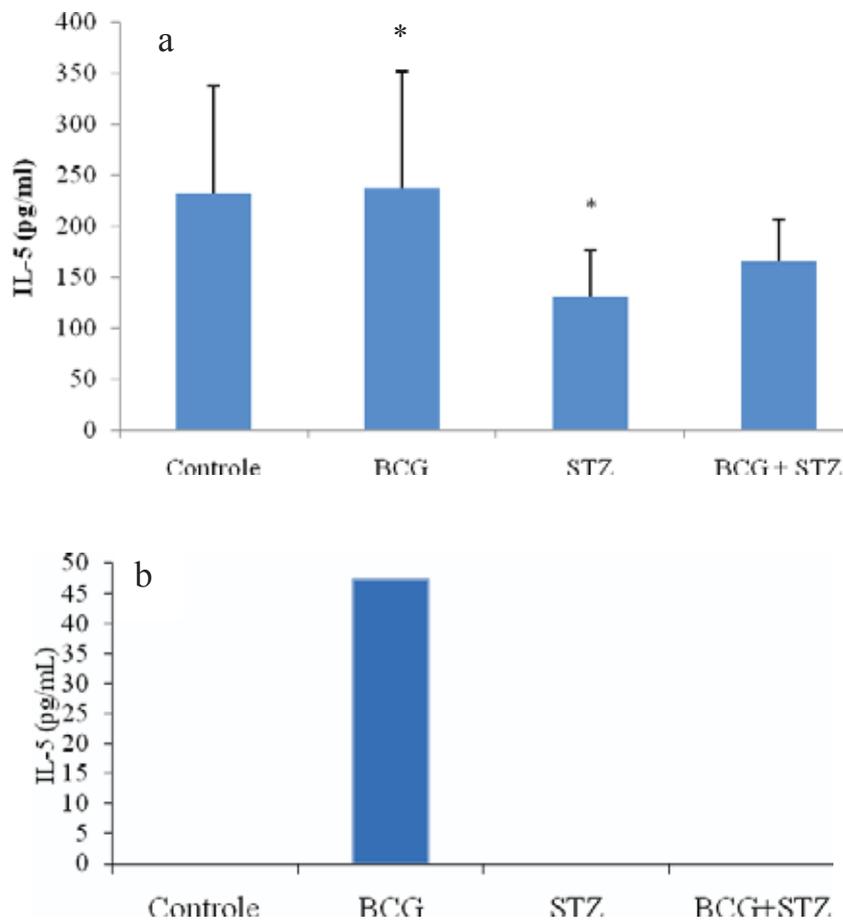


Figura 12 – Produção de IL-5 em camundongos C57BL/6 imunizados com BCG e após a indução de diabetes. As culturas esplênicas foram estimuladas com ConA (a) e os linfonodos também foram estimulados com ConA (b). Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 7 animais por grau. A diferença estatística se dá nos grupos que possuem o * sobre a coluna. $p=0,014$.

Em relação a IL-10, todas as culturas estimuladas com rhsp65 ou ConA produziram níveis mais elevados do que os controles não estimulados. O perfil geral de produção desta citocina foi similar, sendo que o maior nível de IL-10 foi observado nas culturas oriundas dos animais imunizados com BCG. As culturas esplênicas foram estimuladas com rhsp65 (figura 13a) e houve diferença estatística entre os grupos BCG e STZ. As culturas estimuladas com ConA também apresentaram produção dessa citocina, com diferença estatística entre os grupos BCG e STZ e entre BCG e BCG + STZ (figura 13b). Não houve detecção de IL-10 nas culturas de linfonodos.

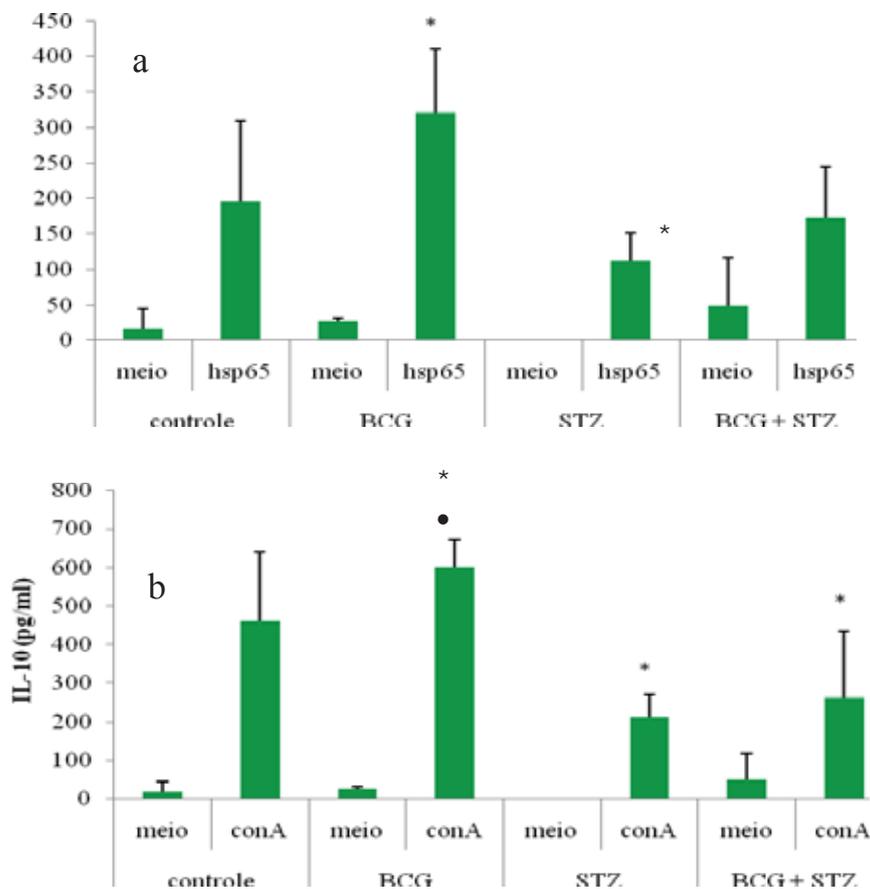


Figura 13 – Produção de IL-10 em camundongos C57BL/6 imunizados com BCG e após a indução de diabetes. As culturas esplênicas foram estimuladas com rhsp65 (a) e ConA (b). Os resultados apresentam a média \pm desvio padrão de 7 animais por grupo. Para a diferença estatística foram usados dois sinais (* e •), as colunas que apresentam símbolos iguais, apresentam diferença estatística $p=0,001$.

5. Discussão

Segundo a hipótese da higiene, o contato com determinados agentes do meio ambiente, tais como helmintos, lactobacilos e micobactérias, serviria como um estímulo para regular processos inflamatórios, incluindo aqueles associados a várias patologias autoimunes. Neste contexto, tem sido sugerido que o BCG, que é uma micobactéria atenuada usualmente utilizada para profilaxia da tuberculose, possa ser também explorada como um agente imunomodulador capaz de diminuir o processo inflamatório que ocorre no diabetes mellitus do tipo 1.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a imunização prévia com BCG seria capaz de alterar o desenvolvimento do diabetes induzido em camundongos C57BL/6 por inoculação de várias doses baixas de streptozotocina (STZ).

Para atingir este objetivo utilizamos três protocolos experimentais. No primeiro avaliamos a resposta imune induzida em camundongos C57BL/6 pela inoculação subcutânea de BCG. A proposta inicial era caracterizar tanto a resposta imune humoral quanto a celular. Até o momento a resposta humoral não foi caracterizada, mas ensaios futuros empregados antígeno solúvel total de BCG e não só a hsp65 como foi o caso, serão executados. Quanto a resposta imune celular, esta foi avaliada através da produção de algumas citocinas após estímulo *in vitro* com hsp65 e ConA.

Em todos os ensaios realizados, a produção de IFN- γ , mas não a de IL-5, foi sempre mais elevada nas culturas oriundas dos camundongos previamente imunizados com BCG. Este tipo de achado é esperado pois coincide com relatos da literatura. Doadores saudáveis apresentaram aumento na produção de IFN- γ após serem imunizados com BCG, indicando o caráter celular da resposta imune a esta vacina (Ravn et.al., 1997). Estudos com camundongos BALB/C comprovaram não só a importância desta citocina, como também a via mais eficaz para a administração da vacina. (Ajdary et al., 2006).

Apesar de mais elevado em relação ao grupo controle, este aumento não apresentou diferença estatisticamente significativa. É possível que isto se deva ao longo tempo decorrido após a imunização (28 dias) e também ao estímulo utilizado. Neste caso empregamos só hsp65 purificada, é possível que uma mistura de antígenos determine um

processo de ativação mais atenuada. Esta possibilidade será testada posteriormente. Também constatou-se produção significativa de IL-10 por células esplênicas estimuladas *in vitro* com rhsp65. Este achado foi considerado muito relevante pois IL-10 é uma citocina com propriedades imunorregulatórias bem estabelecidas (O'Garra et al., 2008). Mais recentemente, a contribuição da IL-10 derivada de células T reguladoras, nos processos inflamatórios, especialmente nas patologias autoimunes vem sendo desvendada (Zhang et al., 2004).

No segundo protocolo padronizamos a indução de diabetes tipo I por inoculação de 5 doses consecutivas e baixas de STZ em camundongos C57BL/6. O protocolo adotado induziu um quadro típico de diabetes caracterizado por aumento de glicemia acima de 200 mg/dl e infiltração de células inflamatórias nas ilhotas de Langerhans, determinando insulite típica. Em função da glicemia elevada e do percentual mais elevado de ilhotas apresentando grau 3 de comprometimento, o período em torno de 3 semanas foi escolhido para dar continuidade a esta investigação.

O terceiro protocolo foi empregado para avaliar o efeito da imunização com BCG no desenvolvimento do diabetes tipo I. Neste caso, os animais foram imunizados com BCG e quatro semanas após foram submetidos à indução de diabetes tipo I por inoculação com STZ. Um das consequências do diabetes tipo I é a perda de peso com atrofia muscular (Zhao, et al., 2008). Por isto avaliamos a variação do peso corporal nos diversos grupos. Como esperado o grupo STZ perdeu peso, sendo esta perda significativa em relação ao grupo BCG. A imunização prévia com BCG bloqueou, de forma discreta, a perda de peso associada à inoculação de STZ.

A imunização prévia com BCG também retardou, de forma muito discreta, o aumento do nível glicêmico. É importante ressaltar, entretanto, que este efeito não impediu a instalação do diabetes nos animais. A análise individual dos animais em termos de grau de insulite também mostrou uma tendência de proteção do BCG. Nos animais previamente imunizados não só constatou-se a presença de algumas ilhotas preservadas como também contabilizou-se um percentual menor de ilhotas nos graus 1 e 2 de comprometimento.

Quando analisados em conjunto, estes resultados sugerem que o BCG tem potencial para proteção mas que o mesmo, por detalhes que ainda precisam ser esclarecidos, não ficou evidenciado nesta abordagem. Dentro de uma gama de possibilidades, pelo menos

duas estratégias deveriam ser investigadas de forma mais imediata. A primeira delas se refere ao tempo decorrido entre a imunização com BCG e o desencadeamento do diabetes. No caso deste projeto, este período foi de 28 dias. Entretanto, Baik et al., 1999, utilizando um protocolo similar ao nosso (porém com um período entre a imunização com BCG e as múltiplas doses de STZ de sete dias), apresentaram resultados com diferença estatística entre os grupos BCG e BCG-STZ no que diz respeito à variação de peso corporal, níveis glicêmicos e graus de insulite. Além do período diferente, eles utilizaram a linhagem CD-1 de camundongo.

A segunda estratégia é baseada nos achados referentes à produção de IL-10 após imunização com BCG. Como descrevemos anteriormente, níveis significativos de IL-10 foram produzidos *in vitro* após estímulo das células esplênicas com rhsp65. Em função destes resultados, imaginamos que um esquema similar deveria ser testado neste modelo. Neste sentido, camundongos C57BL/6 previamente imunizados com BCG seriam submetidos à indução do diabetes com STZ e concomitantemente estimulados *in vivo* pela administração de rhsp65, por via intravenosa. Teoricamente essa hsp65 passaria pelo baço e poderia determinar a liberação aumentada de IL-10, inibindo assim a resposta imune induzida pelos antígenos das ilhotas em função da inoculação de STZ. Alternativamente, a rhsp65 poderia ser administrado após a inoculação de todas as doses de STZ. Neste caso a rhsp65 estaria sendo administrada como uma terapia para impedir o avanço da insulite. O que nos faz prever teoricamente que esta estratégia seria eficaz são os vários relatos existentes na literatura os quais comprovaram a capacidade de hsp65 de estimular a atividade de células T reguladoras, as quais tem reconhecida função anti-inflamatória (van Eden et al., 2005). Além disto, tem sido demonstrado que células T reguladoras podem modificar de forma significativa a evolução do diabetes tanto em modelos experimentais quanto em casos clínicos (Zdravkovic et. al., 2009 e Lindley et al., 2005).

A análise do efeito imunomodulador do BCG, sobre a produção de citocinas, sugere uma possível relação entre a IL-10 e o discreto efeito protetor observado. Quando se compara a produção de IL-10, se constata que ocorreu uma queda significativa na produção desta citocina no grupo STZ, em comparação com o grupo controle, tanto nas células estimuladas com ConA quanto com rhsp65. Entretanto, os níveis desta citocina foram parcialmente regenerados quando os animais foram previamente imunizados com BCG.

Os resultados obtidos mostram que o BCG não impediu o desenvolvimento do diabetes nas condições testadas. Entretanto, consideramos que os mesmos nos permitiram propor novos protocolos e novas abordagens visando profilaxia e/ou terapia para o diabetes experimental.

6. Referências Bibliográficas

1. Adams VC, Hunt JR, Martinelli R, Palmer R, Rook GA, Brunet LR. *Mycobacterium vaccae* induces a population of pulmonary CD11c⁺ cells with regulatory potential in allergic mice. *Eur J Immunol* 2004; 34:631–38.
2. Ajdary S, Dobakhti F, Taghikhani M, Riazi-Rad F, Rafiei S, Rafiee-Tehrani M. Oral administration of BCG encapsulated in alginate microspheres induces strong Th1 response in BALB/c mice. *Vaccine* 2007; 25:4595-601.
3. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106.
4. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347:911-920.
5. Baik SH, Park IB, Choi, KM, Kim YH, Kim NH, Kim SJ, Song GG, Choi, DS. BCG vaccine prevents insulinitis in low dose streptozotocin-induced diabetes mice. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 46:91-97.
6. Di Giacinto, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174:3237-46.
7. Fernando MMA, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD. Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. *Plos Genetics* 2008; 4:1-9.
8. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Resp Crit Care Med* 2006; 173:803-10.
9. Harada M, Kishimoto Y, Makino S. Prevention of overt diabetes and insulinitis in NOD mice by a single BCG vaccination. *Diabetes Res Clin Pract* 1990; 8:85–89.
10. 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.

11. Horwitz MS, Ilic A, Fine C, Rodriguez E, Sarvetnick N. Presented antigen from damaged pancreatic β cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109:79–87.
12. Huppmann M, Ziegler AG, Baumarten A, Bonifacio E. Neonatal Bacille Calmette-Guerin Vaccination and Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:1204-06.
13. Jasinski JM, Eisenbarth GS. Insulin as a primary autoantigen for type 1A diabetes. *Clin Dev Immunol* 2005; 12:181-6.
14. Kohm AP, Fuller KG, Miller SD. Mimicking the way to autoimmunity: an evolving theory of sequence and structural homology. *Trends Microbiol* 2003;11:101-105.
15. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:216-26.
16. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976; 193(4251):415-7.
17. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54:92-99.
18. Liu E, Li M, Jasinski J, Kobayashi M, Gianani R, Nakayama M, Eisenbarth GS. Deleting islet autoimmunity. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48:177-82.
19. Mariño E, Grey ST. A new role for an old player: Do B cells unleash the self-reactive CD8⁺ T cell storm necessary for the development of type 1 diabetes? *J Autoimmun* 2008; 31:301–305.
20. McInerney MF, Pek SB, Thomas DW. Prevention of insulinitis and diabetes onset by treatment with complete Freund's adjuvant in NOD mice. *Diabetes* 1991; 40:715-25.
21. 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.
22. O' Connor RA, Wittmer S, Dalton DK. Infection-induced apoptosis deletes bystander CD4⁺ cells: a mechanism for suppression of autoimmunity during BCG infection. *J Autoimmun* 2005; 24:93-100.
23. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223:114-31.

24. Parent ME, Siemiatycki J, Menzies R, Fritschi L, Colle E. Bacille Calmette-Guérin vaccination and incidence of IDDM in Montreal, Canada. *Diabetes Care* 1997; 20:767-72.
25. Qin HY, Chaturvedi P, Bhagirath S. *In vivo* apoptosis of diabetogenic T cells in NOD mice by IFN- γ /TNF- α . *International Immunology* 2004; 16:1723–32.
26. Qin HY, Singh B. BCG vaccination prevents insulindependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice after disease acceleration with cyclophosphamide. *J Autoimmun* 1997; 10: 271–78.
27. Ravn P, Boesen H, Pedersen BK and Andersen P. Human T cell responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J. Immunol.* 1997; 158:1949-55.
28. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005; 22:359-70.
29. Ricklin Gutzwiller ME, Reist M, Peel JE, Seewald W, Brunet LR, Roosje PJ. Intradermal injection of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in dogs with atopic dermatitis: a multicentre pilot study. *Vet Dermatol* 2007; 18:87–93.
30. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure. *Diabetologia* 2003; 46:305-21.
31. Rook GA. The hygiene hypothesis and the increasing prevalence of chronic inflammatory disorders. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101:1072-74.
32. Sadelain MW, Qin HY, Lauzon J, Singh B. Prevention of type I diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Diabetes* 1990; 39:583–89.
33. Sadelain MW, Qin HY, Sumoski W, et al. Prevention of diabetes in the BB rat by early immunotherapy using Freund’s adjuvant. *J Autoimmun* 1990; 3:671–80.
34. Sanjeevi CB, Das AK, Shtauvere-Brameus A. BCG vaccination and GAD65 and IA-2 autoantibodies in autoimmune diabetes in southern India. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 958:293-96.
35. Sawczenko A, Sandhu BK, Logan RF, Jenkins H, Taylor CJ, Mian S, Lynn R. Prospective survey of childhood inflammatory bowel disease in the British Isles. *Lancet* 2001; 357:1093–94.

36. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg ML. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1260–67.
37. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006; 117:433–42.
38. Tükenmez F, Bahçeciler NN, Barlan IB, Başaran MM. Effect of pre-immunization by killed *Mycobacterium bovis* and *vaccae* immunoglobulin E response in ovalbumin-sensitized new born mice. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10:107-11.
39. van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AG and Yazdanbakhsh M. A novel host–parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002; 277:48122–29.
40. 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.
41. van Eden W, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2005; 3:18-30.
42. Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CA, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 202:1199–212.
43. Yang Y, Santamaria P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110:627-39.
44. Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther* 2005; 12:580-91.
45. Zaccone P, Fehervari Z, Jones FM, Sidobre S, Kronenberg M, Dunne DW, Cooke A. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol* 2003; 33:1439–49.

46. Zdravkovic N, Shahin A, Arsenijevic N, Lukic ML, Mensah-Brown EP. Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *Mol. Immunol* 2009. [Epub ahead of print].
47. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16:249-56.
48. Zhao C, Wang Z, Robertson MW, Davies JD. Cachexia in the non-obese diabetic mouse is associated with CD4+ T-cell lymphopenia. *Immunology* 2008, 125:48-58.