



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



SABRINA CRUZ TFAILE FRASNELLI DE SOUZA

**ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE ALTERA A
RESPOSTA BIOLÓGICA DE LINHAGEM DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS MURINA**

Araraquara

2016



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



SABRINA CRUZ TFAILE FRASNELLI DE SOUZA

**ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE ALTERA A
RESPOSTA BIOLÓGICA DE LINHAGEM DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS MURINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Odontologia – Área de Periodontia, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista para o título de Doutor em Odontologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Araraquara

2016

Souza, Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli de

Elevada concentração de glicose altera a resposta biológica de
linhagem de células dendríticas murina / Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli
de Souza.-- Araraquara: [s.n.], 2016

71 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Periodontia) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Diabetes mellitus 2. Células dendríticas 3. Inflamação I. Título

SABRINA CRUZ TFAILE FRASNELLI DE SOUZA

**ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE ALTERA A
RESPOSTA BIOLÓGICA DE LINHAGEM DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS MURINA**

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

2º Examinador: Prof. Dr. Camila Renata Corrêa Camacho

3º Examinador: Prof. Dr. Sandra Helena Penha de Oliveira

4º Examinador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

5º Examinador: Prof. Dr. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Araraquara, 21 de julho de 2016

DADOS CURRICULARES

SABRINA CRUZ TFAILE FRASNELLI DE SOUZA

NASCIMENTO	21 de Agosto de 1983, Campinas/SP
FILIAÇÃO	Salma Cruz Tfaile Frasnelli Antonio Adilson Frasnelli
2004/2007	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2010/2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2010/2012	Especialização em Periodontia pela APCD de São Carlos/SP.
2012/2016	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

DEDICATÓRIA

A Deus

Pela fé, que me mantém forte. Pela força, que me faz seguir em frente. Por me amparar e me acalmar quando muitas vezes eu pensei em desistir.

In memoriam a minha querida mãe, **Salma**

Por todos os ensinamentos. Pela educação que me proporcionou. Pelo amor incondicional. Por tudo que você representa e a grandeza do seu exemplo para ser seguido. Por mesmo não mais fisicamente presente estar tão presente em todos os momentos de minha vida. Com certeza eu não conseguiria concluir esse trabalho sem você. Eu te amo demais!

Ao meu querido pai, **Adilson**

Por ser esse ser humano incrível. Por estar presente nos momentos mais difíceis e nunca me deixar desistir. Por ser a minha fortaleza e o meu equilíbrio quando eu mais preciso. Por todo seu amor incondicional e por tudo que você representa na minha vida. Eu te amo muito!

Ao meu marido, **Diego**

Pelo apoio e incentivo durante todo desenvolvimento do meu trabalho. Pela paciência e compreensão quando me faltaram. Por estar ao meu lado sempre e inclusive nos momentos mais difíceis que enfrentei. Amo você!

Ao meu querido filho, **Vicente**

Por ser essa pessoinha linda e carismática que encanta a minha vida. Por iluminar todos os meus dias, trazendo a alegria que faltava. Por me fazer acreditar que o amanhã sempre será melhor, porque eu ainda terei você ao meu lado. Amo você mais que tudo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

In memorian, minha querida **mãe**,

Obrigada por tudo que você fez. Com certeza eu não chegaria até aqui sem o seu incentivo. Obrigada por ter me dado a oportunidade de ter sido sua filha e por ter aprendido tanto com você. Obrigada por tudo o que você me ensinou, tenho certeza que a melhor parte mim eu devo a você. É imensa a saudade. Obrigada mãe por tudo!

Ao meu querido **pai**,

Obrigada por todo apoio e incentivo. Por acreditar em mim sempre. Obrigada pela paciência e por tanto acolhimento. Obrigada por não me deixar desistir! Obrigada pai por tudo!

Ao meu **marido**,

Obrigada por caminharmos juntos, mesmo com todas as dificuldades encontradas.

A minha querida **Tuca**,

Obrigada por essa amiga maravilhosa que você é. Por representar uma mãe, uma irmã pra mim. Obrigada por sempre estar ao meu lado com suas palavras de conforto que não me deixam cair nunca. Obrigada por cuidar do meu filho como se fosse seu filho, com muito amor e carinho. Obrigada por estarmos juntas nessa caminhada. Sem você, com certeza eu não teria conseguido concluir mais essa etapa! Amo você com todo meu coração!

Aos meus **familiares, em especial minha avó Carmem, tias Elaine, Samira e Sálua e primos, Sâmia, Sâmara e Nathan**

Por serem tão especiais e acolhedores. Por todo incentivo e contribuição em todas minhas realizações. Obrigada a todos!

In memorian, meu **avô Armindo**,

Por todo carinho me dado. Por todo apoio e incentivo durante toda minha pós-graduação. Por ter sido um avô maravilhoso que sempre com seu jeitinho doce de ser acalmava meu coração e me passava tranquilidade sempre! Obrigada por tudo vô!

A minha orientadora **Profa. Dra. Silvana R. P. Orrico**,

Por todo carinho e apoio nesses anos de convivência. Por todo aprendizado, paciência e compreensão.

Ao meu co-orientador **Prof.Dr. Carlos Rossa Junior**,

Obrigada pela contribuição em minha formação científica, acadêmica e pessoal. Por todo apoio e compreensão nos momentos difíceis e conturbados. Por sua participação em todos os experimentos. Admiro-o por ser justo e solidário quando nós alunos precisamos de você. Minha eterna gratidão!

A querida Profa. Dra. Camila Corrêa

Por me receber tão bem em Botucatu. Por ser essa pessoa incrível e solícita no desenvolvimento do meu trabalho de doutorado. Por estar ao meu lado em um dos momentos mais difíceis que passei. Por todo carinho e apoio que recebi enquanto estive em Botucatu. Muito obrigada!

Aos amigos de Botucatu: **Fabiane, Damiana, Klinsmann, Igor, Maria Eugênia**
Por todo acolhimento e ajuda no meu trabalho. Por toda diversão e jantares que nos rendia boas risadas. Por todo companheirismo sempre que precisei. Muito obrigada!

Aos meus amigos: **Chaine, Lucas, Samia, Mica, Vivian Benetello**

Por todo apoio e carinho em todos os momentos deste trabalho, principalmente quando perdi minha mãe. Vocês são fundamentais na minha vida.

As minhas eternas amigas: **Adriana M. Oguri, Cláudia M. Fontana, Raquel Medeiros, Catarina Silveira, Vivian Harada, Maisa Martini, Carla Correa, Gisele Muranetti, Mandinha, Andressa**

Por acreditarem e torcerem por mim mesmo estando longe por muitas vezes. Por saber que posso confiar em vocês sempre, pois sempre estiveram ao meu lado! Amo vocês!

A minha querida amiga **Ana Cláudia Miranda (Claudinha)**,

Por ter sido minha mãe “postiça” durante toda minha pós-graduação. Por me ouvir, por me aconselhar e por todo carinho e apoio durante minha gestação. Você é muito querida e especial na minha vida.

A minha prima **Sâmara**,

Por todo suporte no desenvolvimento desse trabalho. Pelo carinho e por me acalmar diversas vezes onde tudo parecia não ter fim. Muito obrigada. Amo você.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa de sua Diretora, Profa. Dra. **Elaine Maria Sgavioli Massucato**, e do Vice-Diretor, Prof. Dr. **Edson Alves de Campos**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** (Processo 2912/24196-9) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES** (Processo CAPES AUXPE 655/2014), pelo apoio financeiro.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. **Benedicto Egbert Corrêa de Toledo**, Prof. Dr. **Ricardo Samih Georges Abi Rached**, Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof. Dr. **José Eduardo Cezar Sampaio**, Profa. Dra. **Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, Profa. Dra. **Daniela Leal Zandim-Barcelos** que colaboraram coma minha formação, em especial Profa. Dra. **Silvana Regina Perez Orrico**, e Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior** pela orientação e co-orientação durante a realização desta pesquisa.

Aos meus queridos amigos de pós-graduação: **Li Finoti, Adriana Ortega, Fernanda Florian, Mariana, Leslie, Paula, Jackeline, Vinícius Paiva, Marcell, Giovana, Fernanda Rocha, Mei, Mayara, Livia Moretti, Jônatas, João, Suzane**, e em especial **minhas primas Sâmara e Sâmia** obrigada pelas inúmeras conversas, risadas, conselhos, apoio, incentivo e tantas outras coisas boas que vocês me ofereceram por todo esse tempo juntos!

Aos queridos colegas da Pós-Graduação: **Elton, Lelis, Kahena, Maurício, Guilherme, Camila, Laura Maldonado, Laura Zambrano, Cindy, Rafael, Fausto, Felipe, Vinícius Ibiapina**, pela convivência harmoniosa e companheirismo.

Aos meus companheiros de laboratório: **Adriana, Marcell, Débora**, pelo carinho, paciência e contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, **Claudinha, D. Maria do Rosário, Maria José (Zezé), Ester, Regina Lúcia, Lene, Isabela e Suleima**, por todo trabalho e dedicação que contribuíram para a realização desse trabalho. Além disso, pelo carinho e hospitalidade que sempre me trataram! Vocês são especiais para mim.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **José Alexandre e Cristiano**, pela gentileza, paciência, competência e por resolverem tantas dúvidas e problemas!

Aos funcionários da Biblioteca, **Maria Helena, Marley, Eliane, Odete, Adriano, Maria Inês, Silvia Helena e Ceres**, pela atenção e disponibilidade.

Ao **Sérgio e laboratório São Lucas**, que sempre colaboraram com a pesquisa, solícitos com o desenvolvimento desse trabalho, nos atendendo sempre que era necessário. Muito obrigada!

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Se tiver que amar, ame hoje. Se tiver que sorrir, sorria hoje. Se tiver que chorar, chore hoje. O importante é viver hoje. O ontem já foi e o amanhã talvez não venha”.

Chico Xavier

Souza SCTF de. Elevada concentração de glicose altera a resposta biológica de linhagem de células dendríticas murina [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica importante caracterizada pela ausência de secreção e/ou ação deficiente da insulina, resultando em hiperglicemia crônica e persistente que é a principal característica do DM. A influência do diabetes sobre as doenças periodontais é amplamente documentada e reconhecida demonstrando que a desregulação da resposta imune associada ao diabetes afeta a interação microbiota-hospedeiro no periodonto, aumentando a severidade e extensão da destruição dos tecidos periodontais. Considerando o papel crucial das células dendríticas (DC) no desenvolvimento e regulação da resposta imune e da relativa escassez de informação sobre a influência específica de concentrações elevadas de glicose nas células imunes, investigou-se a hipótese de que a elevada glicose influencia a biologia de DCs. Especificamente, avaliamos a influência da alta de glicose sobre a proliferação e viabilidade, a apoptose, a maturação, a quimiotaxia, a migração para os linfonodos (homing), atividade fagocitária, expressão de mediadores inflamatórios e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Foram utilizadas células dendríticas de linhagem murina (DC2.4), que foram expostas a concentração elevada (25 mM) ou normal (11,1 mM) de glicose, por períodos que variaram de 24 a 72 h. A exposição à alta glicose reduziu a proliferação mas não afetou a viabilidade, a sobrevivência ou a maturação de células DC2.4 induzida por LPS; no entanto a susceptibilidade à apoptose foi aumentada. Alta de glicose também reduziu atividade fagocitária, a quimiotaxia e o homing para os gânglios linfáticos in vivo. Por outro lado, a produção de ROS e expressão gênica de mediadores inflamatórios foram aumentadas em elevadas concentrações de glicose. Coletivamente, os efeitos da alta glicose na biologia de células dendríticas são consistentes e mostram uma diminuição na função de ativação imune de DCs e uma exacerbação da inflamação local.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus, Células dendríticas, Inflamação

Souza SCTF de. Influence of high glucose on the biological response of murine dendritic cell line DC2.4 [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a major metabolic disorder characterized by the absence of secretion and/or impaired insulin action, resulting in chronic and persistent hyperglycemia which is the main characteristic of DM. The effect of diabetes on periodontal diseases is widely recognized and documented demonstrating that dysregulation of the immune response associated with diabetes affects microbial-host interaction in the periodontium, increasing the severity and extent of the destruction of the periodontal tissues. Considering the crucial role of dendritic cells (DCs) in the development and regulation of immune response and the relative scarcity of information on the specific influence of high glucose concentrations on immune cells, we investigated the hypothesis that high glucose influences the biology of DCs. Specifically, we assessed the influence of high glucose on proliferation and viability, apoptosis, maturation, chemotaxis, migration to the lymph nodes (homing), phagocytic activity, expression of inflammatory mediators and production of reactive oxygen species (ROS). We used a murine dendritic cell line (DC2.4), which was exposed to high (25 mM) or normal (11.1 mM) glucose concentrations for periods ranging from 24 to 72 h. Exposure to high glucose reduced proliferation but did not affect viability, survival or LPS-induced maturation of DC2.4 cells; however susceptibility to apoptosis was increased. High glucose also reduced phagocytic activity, chemotaxis and homing to lymph nodes in vivo. On the other hand, production of ROS and gene expression of inflammatory mediators were increased by high glucose. Collectively, the effects of high glucose on dendritic cell biology are consistent with a decrease on immune activating role of DCs and an exacerbation of local inflammation.

Keywords: Diabetes mellitus, Dendritic cell, Inflammation

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Células dendríticas	18
<i>2.1.1 Origem, tipos e ativação</i>	18
2.2 Funções	20
<i>2.2.1 Papel na Imunidade Inata</i>	20
<i>2.2.2 Papel na Imunidade Adquirida/ ativação das células T</i>	21
<i>2.2.3 Tolerância Imunológica</i>	22
<i>2.2.4 Estimulação das células B e manutenção da memória imunológica</i>	22
2.3 Células dendríticas e a imunoterapia	23
2.4 Células dendríticas e a regulação imune no DM e suas complicações	23
2.5 Hiperglicemia como mecanismo biológico na modulação da resposta imune do diabetes mellitus	27
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Indução de Diabetes Mellitus (DM) e modelo de doença periodontal experimental	32
4.2 Cultura celular	33
4.3 Ensaio de Proliferação Celular	34
4.4 Ensaio de apoptose	35
4.5 Maturação/ativação de células dendríticas	36
4.6 Modulação da expressão gênica (RNAm)	37
4.7 Ensaio para avaliação da atividade fagocitária	37
4.8 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	38
4.9 Ensaio de quimiotaxia/migração	39

4.10 Migração para os linfonodos in vivo	40
4.11 Análise estatística	42
5 RESULTADO	43
5.1 Proliferação e Viabilidade	43
5.2 Apoptose	44
5.3 Maturação	45
5.4 Expressão gênica (RNAm)	45
5.5 Atividade fagocitária	48
5.6 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	49
5.7 Quimiotaxia	51
5.8 Migração DC 2.4 para os linfonodos in vivo	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A	71

1 INTRODUÇÃO

Até os anos 60, o início da resposta imune era considerado atributo praticamente exclusivo dos macrófagos devido às suas propriedades de fagocitar antígenos. Já se reconhecia a relevância dos linfócitos como mediadores da resposta imune tardia ou adaptativa, no entanto não se sabia como estes linfócitos localizados nos linfonodos eram ativados pelos antígenos fagocitados pelos macrófagos. Na década de 70, os trabalhos de Steinman e Cohn^{91, 93-95} identificaram células distintas de macrófagos tanto na função quanto na morfologia. Estas células também diferiam dos macrófagos pela expressão de níveis elevados de moléculas MHC classe II (*major histocompatibility complex*) necessárias à apresentação de antígenos; pela presença de projeções citoplasmáticas semelhantes a dendritos; pela quantidade relativamente menor de lisossomos e atividade fagocitária menos intensa.

Denominadas "células dendríticas" (DCs), sabe-se que tem origem hematopoiética e representam o exemplo prototípico de células apresentadoras de antígeno (*Antigen-presenting cells*, APCs), exercendo papéis fundamentais no reconhecimento de antígenos e na resposta imune inata, bem como na ativação e modulação da resposta adaptativa⁴⁶. O reconhecimento inato dos patógenos acontece, primariamente, através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares, como os receptores Toll-like (TLRs)⁴¹. TLR na superfície das células APCs interage com diferentes estruturas de microrganismos, desencadeando uma série de efeitos biológicos. Nas DCs, estes efeitos incluem a ativação, com alterações fenotípicas relacionadas à maturação, favorecendo o direcionamento destas células para órgãos linfóides secundários. Tais alterações fenotípicas incluem o aumento na expressão de moléculas MHC classe II e moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86), além da secreção de citocinas pró-inflamatórias⁹⁹.

Atualmente, são reconhecidas diversas populações distintas de células dendríticas. Elas diferem segundo sua localização ou nicho/microambiente em que exercem suas funções imunomodulatórias, as quais têm o objetivo de manutenção da homeostasia do órgão ou tecido. Assim, são reconhecidas populações de células dendríticas circulantes (periféricas), cutâneas, intestinais, pulmonares e hepáticas. Porém, apenas no início da década de 90 começaram a surgir evidências indicando que, além de sua função estimulatória/ativadora, as células dendríticas também podem ter função inibitória da resposta imune, por meio de mecanismos de tolerância⁹⁰. Esta

função tolerogênica/inibitória das células dendríticas, é suportada e reforçada por outras células com propriedades supressoras e imunomoduladoras¹⁸ e, pode ter implicações importantes tanto na patogênese quanto na terapia de algumas doenças e condições, como a artrite reumatóide, asma e o diabetes tipo 1.

Independentemente de sua origem/localização, as DCs usualmente apresentam um fenótipo inicial denominado imaturo, associado à grande capacidade fagocitária, porém reduzida capacidade de estimular linfócitos. A exposição e fagocitose de antígenos, juntamente com condições e mediadores presentes no microambiente induzem o processo de maturação das DCs, com a migração destas células de tecidos não-linfóides para tecidos linfóides ou para a corrente sanguínea. Este processo de maturação resulta em drástica redução da capacidade fagocitária e marcante aumento da capacidade de estimular linfócitos, incluindo a apresentação de antígenos via MHC classe II, moléculas co-estimulatórias e ativação/polarização fenotípica de células T por citocinas secretadas no microambiente.

Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada essencialmente pela elevação da glicemia, a qual é resultante de uma deficiência absoluta (diabetes tipo 1) ou relativa (diabetes tipo 2) de insulina. A prevalência desta condição dobrou mundialmente nas últimas três décadas²¹, sendo que a prevalência estimada dos casos de diabetes tipo 2 (o mais prevalente, representando de 90 a 95% de todos os casos de diabetes) em 2030 é de 439 milhões de pessoas¹⁴. O custo social e econômico desta condição representa um grave problema de saúde pública, em especial devido à morbidade e mortalidade associadas às complicações relacionadas ao diabetes envolvendo olhos, rins, coração, vasos sanguíneos, nervos e periodonto. De fato, estima-se que para 1 em cada 5 dólares americanos gastos em assistência médica em 2012 foi dedicado ao tratamento do diabetes ou de suas complicações, num custo total estimado em 245 bilhões de dólares apenas nos Estados Unidos e apenas no ano de 2012¹.

A relevância das DCs no diabetes tipo 1 está relacionada diretamente à capacidade destas células induzirem a diferenciação e ativação de células T auto-reativas⁶⁴. Este fato sugere que condições de natureza infecciosa envolvendo interação microbiota-hospedeiro (doenças periodontais) e condições de origem não microbiana associadas à inflamação crônica (diabetes, asma, artrite reumatóide) podem atuar como uma causa subjacente comum a desregulação funcional das DCs. Assim, considera-se que a desregulação da resposta imune (representada pela manutenção de um estado

inflamatório crônico) associada especificamente ao diabetes tipo 2, esteja associada ao desenvolvimento do próprio diabetes e de suas complicações associadas, incluindo neuropatia, nefropatia, retinopatia e doenças periodontais²⁷. A influência do diabetes sobre as doenças periodontais é amplamente documentada e reconhecida^{13, 53, 70, 84}, demonstrando que a desregulação da resposta imune associada ao diabetes afeta a interação microbiota-hospedeiro no periodonto.

Os mecanismos biológicos responsáveis pela patogênese destas complicações associadas ao diabetes vêm sendo intensamente estudados. O mecanismo mais extensamente estudado envolve a maior formação e acumulação de compostos glicosados no paciente diabético mal controlado, resultante da elevação crônica da glicemia. Estes compostos, denominados coletivamente produtos finais da glicação avançada (AGEs, “*advanced glycation end-products*”) interagem com receptor de padrões moleculares (RAGE, “*receptor for advanced glycation end-products*”) expressos em diversos tipos celulares e resulta na modulação de diferentes aspectos da biologia celular.

Considerando o papel crucial das DCs no desenvolvimento e regulação da resposta imune tanto no diabetes quanto nas doenças periodontais (como um exemplo de condição inflamatória crônica de origem infecciosa), este estudo teve por objetivo avaliar a influência da hiperglicemia na biologia das DCs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células dendríticas

2.1.1 Origem, tipos e ativação

Células dendríticas são células hematopoiéticas que pertencem à família de células apresentadoras de antígenos, onde também se destacam os linfócitos B e os macrófagos. O papel destas células como APCs era pouco apreciado até na década de 70, quando Steinman e Cohn⁹¹ (1973) identificaram pela primeira vez células DCs, extraídas do baço de camundongos, como potentes estimuladores da resposta imunológica primária (Merad, Manz⁶⁸, 2009).

Conceitualmente, as células dendríticas têm origem hematopoiética a partir de precursores localizados na medula óssea, as quais originam as células dendríticas periféricas que semeiam diferentes órgãos e tecidos, inicialmente como células imaturas (Banchereau et al.³, 2000). Alguns autores descrevem mais de um subtipo de células dendríticas em um mesmo nicho, como células dendríticas cutâneas (Henri et al.⁴⁸, 2010), e até mesmo células dendríticas periféricas (raras entre as PBMCs no sangue periférico, perfazendo menos de 1% dos números totais de leucócitos). As duas classes distintas de DCs podem ser mielóides (mDC, alta atividade fagocítica e expressão de diversos TLRs, sendo capazes de reconhecer antígenos bacterianos e virais) (MacDonald et al.⁶⁶, 2002; Steinman, Inaba⁹², 1999) e as células dendríticas plasmocitóides (pDC, derivadas de precursores linfóides e que expressam predominantemente TLR-7 e -9, reconhecendo primariamente antígenos virais e com elevada produção de interferon) (Colonna et al.¹⁷, 2004; Gilliet et al.⁴⁵, 2008).

Em camundongos, DCs imaturas são caracterizados pela expressão de CD11c, níveis reduzidos de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, e baixos níveis de MHC de classe II. Curiosamente, também podem expressar marcadores de células T como CD4 e CD8. Três diferentes subtipos dessas células foram observados no baço dos animais: CD4+/CD8-, CD4-/CD8+ e CD4-/CD8- (Granucci et al.⁴⁷, 2005). Outra molécula que tem sido utilizada para identificar os subtipos de DC em camundongos é CD11b, constituindo assim a formação de uma população de dendrítica que são identificadas em todos os linfonodos: CD4-CD8-CD11b+. E finalmente, o quinto marcador de células dendríticas em camundongos é representado pela Langerina, molécula tipicamente produzida pelas células de Langerhans, população imatura de DC localizadas na pele (Granucci et al.⁴⁷, 2005).

Em humanos, os tipos de células dendríticas são menos caracterizados, e a maior parte das informações destes subtipos é obtida a partir de estudos *in vitro*. Dendríticas humanas não expressam CD8 e, em baço e amígdalas, DCs diferencialmente positivas para CD11b, CD11c e CD4 foram identificadas (Shortman, Liu⁸⁸, 2002). Monócitos CD14+ podem gerar DCs nas condições adequadas (na presença de GM-CSF e IL-4), o que implica que a população de células monocíticas pode servir como fonte de precursores de células dendríticas, que se diferenciam em condições externas (microambiente) apropriadas. Além destas possibilidades, também existem evidências indicando que DCs possam se originar de precursores linfocíticos, os quais poderiam originar também células T, B e NK, dependendo das condições e estímulos externos (microambiente). É possível que estas diferentes origens resultem em distintos subtipos de DCs que podem apresentar diferenças fenotípicas e funcionais. Por exemplo, DCs de origem linfóide expressam o marcador CD8 e podem exercer efeito supressor sobre células T por meio da indução de apoptose via FasL, diferentemente de DCs de origem mielóide (CD8-) que não exercem este efeito supressor (Suss, Shortman⁹⁷, 1996). Mesmo quando derivadas do precursor mielóide comum (caracterizado pela expressão do marcador CD34), pelo estímulo com GM-CSF e TNF, aquelas diferenciadas a partir de células monocíticas (CD14+) são capazes de suportar a proliferação e diferenciação de linfócitos B, enquanto as DCs originadas de células CD14- mas CD1a+ não têm esta capacidade.

Independentemente de sua origem, as DCs usualmente apresentam um fenótipo inicial denominado imaturo. Após o contato com o antígeno, ou mesmo a exposição a mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, o processo de maturação é ativado e as DCs migram pelos vasos linfáticos até os órgãos linfóides secundários. Com isso, ocorre o aumento da expressão de alguns receptores de quimiocinas como CCR7, relacionada à localização/atração das células aos linfonodos e inibição da expressão de outros receptores de quimiocinas, como CCR5 e CCR6, relacionados à localização/atração a sítios com inflamação ativa. Além disso, ocorre drástica redução da capacidade fagocítica e marcante capacidade estimulatória de linfócitos incluindo a apresentação de antígenos via MHC classe II, de moléculas co-estimulatórias [CD40, CD80, CD86, DC-SIGN (molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 e específica das DC)] e de citocinas associadas à polarização fenotípica de células T. Em síntese, durante este processo de maturação, as células dendríticas abandonam os tecidos periféricos, entram nos vasos linfáticos aferentes e migram para

os gânglios linfáticos onde interagem com os linfócitos T virgens (*naive*) e iniciam uma resposta imunológica específica (Cruvinel et al.¹⁹, 2010).

Interessante notar que além destes sinais comuns à ativação da resposta imune adaptativa, evidências mais recentes indicam que as células dendríticas expressam um “4º sinal” de ativação de células T, representado pela orientação ou direcionamento (*homing*) da célula T educada no linfonodo ao tecido ou órgão de interesse. Por exemplo, no intestino TGF-beta e ácido retinóico produzido pelas células dendríticas induzem à expressão de CCR9 nas células T, o qual é importante para o *homing* destas células ao intestino (Weiner et al.¹⁰⁰, 2011). De forma similar, células dendríticas cutâneas liberam metabólitos de vitamina D que induzem a expressão de CCR10 pelas células T, o qual é importante para o *homing* destas células para a pele (Sigmundsdottir et al.⁸⁹, 2007).

2.2 Funções

Basicamente as funções das células dendríticas podem ser categorizadas e cada uma delas envolve a apresentação de antígenos. Os estudos mostram o papel das DCs: na imunidade inata; imunidade adquirida; manutenção da tolerância imunológica e manutenção da memória imunológica (Granucci et al.⁴⁷, 2005).

2.2.1 Papel na Imunidade Inata

Entre as células que estão envolvidas no sistema imune inato, as células natural killer, que são linfócitos que atuam na resposta imunológica inata, apresentam papel importante e de destaque na erradicação das infecções (Moretta⁷¹, 2002). Estudos mostram a importância das células dendríticas nos estágios iniciais da resposta imune, e o predominate papel destas células na ativação das células NK tanto em ensaios clínicos como estudos in vivo (Ferlazzo et al.³⁴, 2002; Fernandez et al.³⁵, 1999; Piccioli et al.⁸², 2002).

O primeiro contato entre estas células pode ocorrer nos sítios de infecção e tanto as dendríticas residentes como as recrutadas poderiam ser capazes de ativar as células NK. Além disso, determinadas subpopulações de NK são capazes de responder aos estímulos produzidos pelas DCs, como IL-12 que induz à produção de IFN- γ por NK, assim como IL-15 que induz à proliferação destas células (Granucci et al.⁴⁷, 2005).

As células dendríticas ativadas por bactérias também podem induzir a função citotóxica das células NK e esse fenômeno é dependente da produção de IFN tipo I e IL-

2 (Diebold et al.²⁶, 2003). A importância biológica deste tipo de interação celular na resposta imunológica se deve ao fato de que a citotoxicidade pode contribuir para controlar as fases tardias da resposta inata, limitando a inflamação e restaurando o equilíbrio homeostático após a inflamação (Ferlazzo et al.³³, 2003; Zitvogel¹⁰⁷, 2002).

Está bem estabelecido que a ativação das células NK mediadas pelas DCs exige o contato célula-célula, e a interação entre estas células imunes não é unidirecional. Sob determinadas condições, NKs podem contribuir para ativação e maturação de células dendríticas (Granucci et al.⁴⁷, 2005).

2.2.2 Papel na Imunidade Adquirida/ ativação das células T

Durante sua vida útil, as DCs imaturas migram da medula óssea pela corrente sanguínea atingindo tecidos periféricos, onde se tornam células residentes, como a pele (células de Langerhans). A função destas células ainda imaturas é capturar patógenos invasores e corpos estranhos. Os antígenos capturados são processados dentro da célula e apresentados em sua superfície, inseridos em moléculas do MHC. Dependendo do tipo de antígeno capturado (protéicos ou lipídicos) estes são apresentados por moléculas MHCs clássicas (classes I e II) ou por moléculas MHCs não clássicas, como CD1. Após esse contato e também a exposição destas células a mediadores inflamatórios, ocorre a indução do processo de maturação das DCs, caracterizado por profundas mudanças fenotípicas, incluindo sua migração para os tecidos linfóides. A capacidade de interação das dendríticas com os linfócitos T não tem sido atribuído a molécula específica de superfície ou molécula secretada, mas sim a uma combinação de fatores tais como: elevado nível de expressão de proteínas co-estimuladoras de membrana celular, secreção de citocinas específicas e eficientes ferramentas no processamento de antígenos, propriedades estas adquiridas durante o processo de maturação das células dendríticas (Cruvinel et al.¹⁹, 2010).

Resumidamente, após o estabelecimento da sinapse imunológica entre DC e linfócitos ocorre o início das respostas imunológicas primárias. As células dendríticas fornecem três sinais necessários para ocorrer proliferação e diferenciação de linfócitos T virgens. O primeiro sinal diz respeito à interação entre os complexos principais de histocompatibilidade I ou II acoplados aos antígenos e o TCR presente nos linfócitos TCD8+ ou CD4+, respectivamente. O segundo sinal ocorre após a interação entre as moléculas acessórias das superfícies das células dendríticas e os respectivos ligantes na superfície dos linfócitos. Este sinal é primordial para que ocorra a diferenciação dos

linfócitos T *naive* em células T efetoras. O terceiro sinal ocorre devido à secreção, ou a não secreção, de algumas citocinas inflamatórias como a IL-12, que contribui para a polarização dos linfócitos T virgens em células Th1 ou Th2, respectivamente (Lipscomb, Masten⁶², 2002).

O processamento e apresentação de antígenos podem ativar ambos CD4+ e CD8+ naive células T (Lipscomb, Masten⁶², 2002). As DCs podem reter o antígeno nos órgãos linfóides por períodos extensos, o que pode contribuir para a memória imunológica (Wallet et al.⁹⁹, 2005). Essas células são fundamentais para o início e a coordenação da resposta imunológica adquirida, pois além de regularem a diferenciação, a maturação e a função de linfócitos T de modo contato-dependente e por secreção de fatores solúveis, também estão envolvidas na migração de outros tipos de células imunes dentro dos linfonodos, via secreção de quimiocinas (Wallet et al.⁹⁹, 2005).

2.2.3 Tolerância Imunológica

No início da década de 90 começaram a surgir evidências indicando que, além de sua função estimulatória da imunidade, as células dendríticas também podem ter função inibitória da resposta imune, por meio de mecanismos de tolerância (Steinman⁹⁰, 1991). Esta função tolerogênica/inibitória das células dendríticas, são reforçadas por outras células com propriedades supressoras e imunomoduladoras (Creusot et al.¹⁸, 2014), e pode ter implicações importantes tanto na patogênese quanto na terapia de algumas doenças e condições, como a artrite reumatóide, asma e o diabetes tipo 1. A tolerância de células T, por exemplo, acontece por meio da eliminação (deleção), inativação ou supressão de células T auto-reativas. Estas funções podem ser realizadas por uma variedade de APCs tolerogênicas, as quais têm a capacidade de indução/direcionamento das células T reguladoras (Tregs) e /ou células B (Bregs) (Creusot et al.¹⁸, 2014).

2.2.4 Estimulação das células B e manutenção da memória imunológica

As células dendríticas podem contribuir para estimulação das células B nos linfonodos, por meio da liberação de citocinas e fatores de crescimento pelas DCs, que são críticos para ativação e diferenciação das células B. As células dendríticas foliculares (FDCs) que são encontradas nos centros germinativos dos linfonodos parecem ser importantes para a manutenção da memória imunológica a partir das

células B. Estas células não estão envolvidas diretamente na produção de anticorpos frente a um corpo estranho, mas uma vez estimulada esta produção, as FDCs tendem a formar complexos de antígenos e anticorpos que atuam como “reservatório” e como fonte de estimulação contínua das células B. Assim, por sua vez, as células B podem apresentar os antígenos formados a partir das FDCs para as células T (Lipscomb, Masten⁶², 2002).

2.3 Células dendríticas e a imunoterapia

Há um grande interesse sobre como as células dendríticas podem ser exploradas no desenvolvimento de imunoterapias. Atualmente a literatura mostra estudos que focam as DCs como adjuvantes para vacinas ou terapia direta para induzir a imunidade contra o câncer (Fong, Engleman³⁶, 2000). Estes estudos são desenvolvidos em sua maioria em modelo animal e estão intimamente associados à função tolerogênica que as DCs podem exercer. Esta utilização terapêutica no bloqueio de respostas imunológicas também pode estar envolvida com o tratamento de reações alérgicas, doenças auto-imunes e na rejeição de transplantes (Lipscomb, Masten⁶², 2002).

Desde que foram descritas pela primeira vez em meados dos anos 70, o entendimento das células dendríticas e do seu papel na regulação imunológica tem crescido exponencialmente. A literatura mostra uma abordagem ampla destas células tanto no desenvolvimento de diversas enfermidades como na aplicação de terapias e vacinas. Isso deve-se ao fato das células dendríticas atuarem como uma “ponte” entre resposta imune inata e adquirida, tornando importante compreender os mecanismos que regulam a homeostase de subconjuntos de DCs e assim, melhor utilizar seu potencial terapêutico.

2.4 Células dendríticas e a regulação imune no DM e suas complicações

O Diabetes mellitus compreende condições metabólicas que exibem níveis elevados de glicose no plasma, que ocorrem como resultado de defeito na produção ou na ação da insulina. Existem três tipos principais de DM: tipo 1, tipo 2 e gestacional. O Tipo 1 é uma doença auto-imune que destrói as células produtoras de insulina no pâncreas e é responsável por 3-5% de todos os casos de DM em todo o mundo. O DM tipo 2 ocorre devido a uma combinação de fatores como resistência à insulina e produção deficiente de insulina, representando mais de 90% dos casos. O terceiro grupo, DM gestacional, afeta uma em cada 25 gestações em todo o mundo, e se não

tratada, pode levar a taxas mais elevadas de morte e anomalias fetais (Stewart et al.⁹⁶, 2016).

O aparecimento da doença está relacionado a fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais (King et al.⁵⁴, 1994), com aumento da prevalência em todo o mundo, sendo estimado que mais de 300 milhões de indivíduos serão afetados até 2030 (Wild et al.¹⁰¹, 2004). Entre 1990 e 2010, o DM subiu do 15º para o 9º lugar em uma lista mundial de causas de morte (Stewart et al.⁹⁶, 2016). Muitos destes pacientes, particularmente do tipo 2, permanecem sem diagnóstico por muitos anos, uma vez que a hiperglicemia aparece gradualmente, gerando pouca sintomatologia no início da doença (DeFronzo, Ferrannini²², 1991).

Essa desordem metabólica pode afetar os sistemas funcionais de diversos órgãos do corpo resultando em sérias complicações as quais podem ser classificadas em micro e macrovasculares (Deshpande et al.²⁵, 2008). Complicações microvasculares envolvem neuropatia, retinopatia e nefropatia. As macrovasculares estão associadas às doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais e complicações vasculares periféricas, envolvidas nos processos de gangrena, levando muitas vezes à amputação de membros (Deshpande et al.²⁵, 2008).

Os componentes biológicos da defesa do hospedeiro que podem ser prejudicados pelo diabetes têm sido alvo de muitos estudos, principalmente em relação à resposta imune inata, como os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) (Peleg et al.⁸⁰, 2007). A adesão de PMNs ao endotélio vascular é aumentada no diabetes (Delamaire et al.²⁴, 1997), no entanto, a transmigração desses leucócitos é prejudicada de forma proporcional ao aumento na concentração dos AGEs (Collison et al.¹⁶, 2002). Alterações tanto na quimiotaxia quanto na capacidade bactericida das células PMNs têm sido mostradas em pacientes com diabetes tipo 1 e 2, sugerindo maior susceptibilidade à infecção nesses pacientes (Delamaire et al.²⁴, 1997). Tais alterações geralmente estão associadas a fatores como influência genética, fatores imunológicos, metabolismo e complicações degenerativas.

A resposta imune tem papel etiológico no diabetes tipo 1, uma condição com características 'auto-imunes', uma vez que pode resultar do ataque de linfócitos T às células beta produtoras de insulina do pâncreas (Li et al.⁵⁸, 2009). No diabetes tipo 2, a resposta imune também pode ter papel etiológico, uma vez que a elevação dos níveis séricos de marcadores inflamatórios, como IL-6 e proteína C-reativa, estão associados a maior risco de desenvolvimento do diabetes, com evidências que o estado

hiperinflamatório associado à obesidade pode causar a resistência à insulina (Shi et al.⁸⁷, 2006). Assim, é recíproca a influência que o diabetes pode ter na resposta imune do hospedeiro (menor resistência à infecção (Pertynska-Marczewska et al.⁸¹, 2004), com a inibição da função de polimorfonucleares, agravamento de alterações nervosas e vasculares, aumento da severidade e extensão das doenças periodontais), e que a modulação da resposta imune/inflamatória pode ter sobre o diabetes (tanto na etiologia/estabelecimento, quanto na manutenção e descontrole metabólico).

Diante disso, a literatura destaca também o papel crucial das células dendríticas na regulação da resposta imune, tanto no diabetes quanto no desenvolvimento de suas complicações, como por exemplo, as doenças periodontais.

Recentemente, foi verificada uma significativa redução de células dendríticas na pele (células de Langerhans) de indivíduos portadores de diabetes tipo 2, em comparação a indivíduos não diabéticos. Uma vez que estas células dendríticas residentes (Langerhans) têm função primariamente tolerogênica, sua redução pode estar relacionada a um aumento da inflamação subcutânea, a qual, por sua vez, pode estar relacionada ao agravamento da neuropatia periférica e a outras complicações associadas à doença, como úlceras crônicas e infecções cutâneas (Ziegler et al.¹⁰⁶, 2014). Em contraste a estes resultados, outro estudo recente em modelos murinos de retinopatia associada ao diabetes tipo 1 e tipo 2, demonstrou que a indução de diabetes tipo 1 resultou em aumento progressivo e significativo de DCs no epitélio basal da retina. Também mostrou que os animais obesos com diabetes tipo 2, apresentaram número constante e também significativamente elevado de DCs em comparação aos controles não-diabéticos (Leppin et al.⁵⁷, 2014). Estes achados foram correlacionados pelos autores com a redução do número de feixes de fibras nervosas na córnea dos animais, a qual pode estar relacionada à inflamação neurogênica exacerbada pelo aumento de DCs. Assim, existem evidências de alteração na função de DCs no diabetes tipo 2, que podem afetar de forma diferencial DCs residentes (primariamente tolerogênicas) e outros subtipos de DCs.

Condições inflamatórias crônicas são, em geral, prejudiciais ao organismo por resultarem em destruição tecidual, em particular nos episódios de exacerbação nas doenças periodontais, artrite reumatóide e asma. A manutenção de uma inflamação crônica implica na provável persistência do agente/antígeno iniciador. Isso implica na possibilidade da utilização de células dendríticas mielóides (que não são eficientes indutoras da morte de microrganismos fagocitados, por exemplo) como um nicho

protetor ou acumulador destes antígenos (Neller et al.⁷⁶, 2014; Palucka, Banchereau⁷⁹, 2002). Uma segunda possibilidade é a subversão da função imunoestimuladora destas células, seja pela redução de sua efetividade, seja pela indução de propriedades inibitórias ou reguladoras negativas (células dendríticas reguladoras) (Gordon et al.⁴⁶, 2014). Em relação à primeira possibilidade (DCs como nicho para patógenos/antígenos), alguns trabalhos com doença periodontal, como de Carrion et al.¹¹ (2012), relataram expansão de subtipos de células mDC (CD1c+DC-SIGN+) em pacientes portadores de periodontite crônica. Foi demonstrada que estas células carregavam o periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis*, além de outras espécies microbianas, e não apresentavam expressão de moléculas acessórias importantes na ativação da resposta imune. Outras alterações funcionais das células dendríticas podem estar relacionadas à doença periodontal destrutiva crônica como: falta de maturação apropriada, deficiência na migração e na sinalização para as demais células imunes (Cutler, Teng²⁰, 2007).

O microambiente em que as DCs estão localizadas e sua exposição a diferentes moléculas, ligantes de TLRs, IL-10, IL-1, TNF, Interferon e outros decidirão o padrão de ativação de células dendríticas. Por exemplo, a exposição de DCs semi-maduras a IL-10 induz à polarização de células Tregs (CD25+/FoxP3+) (Li et al.⁶¹, 2010). De forma similar, a ativação preferencial de TLR2 por LPS de *P. gingivalis* (periodontopatógeno) induz à maturação de DCs com baixo potencial imunoestimulatório (Kanaya et al.⁵¹, 2009). Células dendríticas derivadas de indivíduos portadores de periodontite mostraram-se mais imaturas, porém com expressão de um perfil de citocinas pró-inflamatórias (sem o aumento da produção de IL-10), em comparação a DCs de pacientes periodontalmente saudáveis, indicando uma desregulação importante da função de DCs em pacientes com periodontite crônica.

Apesar da abordagem crescente na literatura sobre o papel das DCs na periodontite, ainda existem algumas questões que devem ser melhor investigadas. Do ponto de vista imunológico, a gengiva representa um tecido intrigante e apresenta constante estado inflamatório, de baixo grau, independente da natureza tolerogênica da cavidade oral. Ainda são necessárias abordagens que tragam conhecimentos mais específicos sobre os mecanismos envolvidos na transição da imunidade periodontal protetora para destrutiva, facilitando assim a transposição destes conhecimentos para as estratégias terapêuticas (Wilensky et al.¹⁰², 2014).

2.5 Hiperglicemia como mecanismo biológico na modulação da resposta imune do diabetes mellitus

O diabetes não controlado se caracteriza pela elevação da glicemia, que interage com diversas proteínas circulantes do plasma e resulta na formação dos produtos finais da glicação avançada. Estes AGEs podem exercer inúmeros efeitos biológicos e seu acúmulo foi demonstrado em rins (Oldfield et al.⁷⁸, 2001), placas ateroscleróticas (Forbes et al.³⁷, 2004), coração (Candido et al.¹⁰, 2003) e outros sítios acometidos por complicações associadas ao diabetes. A relação causal entre o aumento de AGEs e as complicações do diabetes foi demonstrada em modelos animais, nos quais a inibição dos AGEs reduziu significativamente o processo de aterosclerose em animais com diabetes induzido sem, no entanto, afetar o controle da glicemia (Forbes et al.³⁷, 2004).

AGEs exercem seus efeitos pela ligação com seu receptor de membrana, RAGE. Este receptor é capaz de interagir com diversos ligantes distintos, agindo como um receptor de reconhecimento de padrões moleculares, semelhante aos receptores envolvidos na resposta imune inata (Neeper et al.⁷⁵, 1992). Seu papel na modulação da resposta imune/inflamação é demonstrado pelo seu envolvimento em diversas condições inflamatórias, incluindo artrite reumatóide e doenças inflamatórias dos rins e intestinos (Bierhaus et al.⁵, 2006), além de servir como receptor de adesão de leucócitos às células endoteliais, promovendo o recrutamento e extravasamento destas células aos tecidos. No periodonto, a expressão de RAGE foi demonstrada no endotélio e nas camadas basais e espinhosas do epitélio do sulco, associada à inflamação. Além disso, a expressão gênica de RAGE foi significativamente maior no epitélio de pacientes com diabetes (Katz et al.⁵², 2005).

O papel central do eixo AGE/RAGE é de estimulação da resposta imune, como demonstrado por estudos *in vitro*, em que o tratamento com AGEs aumentou a produção de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e VEGF por monócitos (Li et al.⁵⁹, 2007; Miyata et al.⁶⁹, 1996; Pertynska-Marczewska et al.⁸¹, 2004) de metaloproteases de matriz (MMP) -1, -3, -13, TNF- α , iNOS e Cox-2/PGE2 por condrócitos (Nah et al.⁷³, 2008; Nah et al.⁷⁴, 2007), de IL-6 e proteína quimioatraente de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) por fibroblastos (Liu et al.⁶³, 2010), além de inibir a proliferação, produção de colágeno tipo I, atividade de fosfatase alcalina e induzir apoptose em osteoblastos (Gangoiti et al.⁴⁰, 2008). Já em fibroblastos gengivais, o estímulo com AGE inibiu a produção de colágeno tipos I e III (Repeke et al.⁸⁵, 2010). Avaliações mais

amplas dos efeitos de AGEs em macrófagos murinos, utilizando arrays focados para detecção de citocinas inflamatórias, relatam que o estímulo com AGE-BSA (albumina sérica bovina glicada) resultou em indução significativa de IL-6, TNF- α e MCP-1, e que a cinética de indução destas citocinas foi semelhante à observada após estímulo com LPS (realizado separadamente, como controle positivo) (Berbaum et al.⁴, 2008). Os autores não observaram regulação de IL-10, IL-12 ou interferon- γ após estímulo com AGE-BSA ou LPS. Microarrays focados foram utilizados na avaliação dos efeitos de AGE-BSA e AGE-lisozima em fibroblastos dérmicos humanos, demonstrando a modulação significativa de 16 de 127 genes avaliados, incluindo inibição da expressão de colágeno tipos I e III, de outros genes relacionados à adesão celular (fibronectina, decorin, integrinas) e aumento da expressão de MMP-9. Porém, apesar de certo consenso na literatura em relação aos efeitos pró-inflamatórios da ativação do eixo AGE/RAGE, há uma variabilidade nas vias de sinalização intracelular ativadas bem como nos efeitos biológicos desta ativação (por exemplo, proliferação celular, apoptose e expressão gênica), segundo o tipo celular e tipo/forma de preparo do AGE utilizado (Xie et al.¹⁰³, 2008; Yan et al.¹⁰⁴, 2009). Mesmo in vivo, devido à heterogeneidade estrutural e bioquímica dos AGEs, é provável que nem todos os AGEs interajam com RAGE.

A literatura apresenta resultados controversos em relação ao papel de AGE-RAGE na modulação de funções biológicas, em diferentes tipos celulares e condições. Nosso grupo de pesquisa, por exemplo, não observou papel relevante de RAGE, associado ou não à ativação de TLR4, na apoptose e proliferação de PBMCs humanos (Frasnelli et al.³⁸, 2015).

Especificamente em DCs, existem evidências indicando um papel importante para AGEs/RAGE em condições pulmonares, como danos relacionados ao fumo, pneumonia intersticial e doença granulomatosa pulmonar, com aumento da expressão de S100B (ligante de RAGE) por DCs pulmonares (Morbini et al.⁷⁰, 2006). Evidências indicam que ligantes de RAGE, como S100B e a proteína HMGB1 (*High Mobility Group Box-1 protein*), têm papel importante na maturação e migração de DCs para os linfonodos. A maturação de pDCs em resposta à ativação de TLR9 é parcialmente inibida pela interferência no eixo HMGB1/RAGE (Dumitriu et al.²⁹, 2005); enquanto a maturação de DCs em resposta à LPS é atenuada pelo bloqueio de HMGB1 ou de RAGE, os quais inibem a expressão de CXCR4 e CCR7 afetando a migração e *homing* das DCs. De fato, a migração de DCs induzida por CXCL12/CXCR4 é, em parte,

dependente da expressão endógena de HMGB1 (ligante de RAGE) (Campana et al.⁹, 2009). Compostos glicosados, como BSA-AGE induzem à maturação de DCs e acentuam o efeito estimulatório sobre a proliferação e expressão de citocinas por células T, além de aumentarem a expressão de RAGE nas próprias células dendríticas, num provável *loop* autócrino de estimulação (Ge et al.⁴⁴, 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que outro AGE (glicoproteína β 2-I glicada) induziu maturação em DCs imaturas e também acentuou a proliferação de células T induzida pelas DCs, com desvio de polarização fenotípica das células CD4⁺ para Th2, sendo estes efeitos marcadamente bloqueados pela inibição de RAGE (Buttari et al.⁸, 2011).

No entanto, os efeitos da hiperglicemia ainda são relativamente pouco explorados pela literatura (e não dos compostos glicosados e/ou ativação de RAGE), principalmente sobre a participação das células dendríticas na modulação do diabetes. Em relato recente, a alta concentração de glicose, *in vitro* e *in vivo*, foi associada ao aumento da susceptibilidade de apoptose de DCs induzida por LPS, por meio da inibição da atividade de sinalização pelas vias MAPK/ERK e AKT (Feng et al.³², 2014). Este estudo indica uma importante interface entre a alta concentração de glicose, característica fundamental do diabetes, e resposta imune, por meio de regulação da sobrevivência das células dendríticas a um desafio antigênico, sugerindo um possível mecanismo pelo qual indivíduos diabéticos são mais susceptíveis à infecção. Em macrófagos, as condições diabéticas de elevada glicemia aumentam a expressão de *scavenger receptors* CD36, SR-A e LOX-1 (Fukuhara-Takaki et al.³⁹, 2005; Gautam, Banerjee⁴³, 2011; Li et al.⁶⁰, 2004), responsáveis pela internalização de colesterol de baixa densidade oxidado (ox-LDL) e conversão destas células em “*foamcells*”, que estão relacionadas ao agravamento da inflamação e de condições como a aterosclerose, complicação vascular associada ao diabetes. A exposição de DCs a elevadas concentrações de glicose também aumentou a expressão dos *scavenger receptors* CD36, SR-A e LOX-1, com o correspondente aumento da internalização de ox-LDL e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*). Estes efeitos foram acompanhados de aceleração do processo de maturação das DCs, indicado pela expressão de CD83 e CD86 de forma proporcional à concentração de glicose adicionada; bem como de aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-6 e IL-12 e inibição da citocina anti-inflamatória IL-10 (Lu et al.⁶⁵, 2013). Mesmo limitadas em quantidade e considerando as variações nos modelos e desenhos experimentais [*in vivo*/ *in vitro* em camundongos no trabalho de Feng et al.³² (2014),

enquanto Lu et al.⁶⁵ (2013) estudaram células humanas in vitro], coletivamente, estas informações indicam que a biologia das DCs é influenciada por elevadas concentrações de glicose, sendo estes efeitos dependentes da situação específica: exposição a LPS/antígenos ou apenas exposição a elevadas concentrações de glicose, sem outros estímulos concomitantes.

3 PROPOSIÇÃO

A hipótese primária deste projeto foi que **elevadas concentrações de glicose influenciariam a biologia de células dendríticas**. Especificamente, investigamos em células dendríticas a influência de elevadas concentrações de glicose na proliferação, sobrevivência, maturação, migração para os linfonodos in vivo (*homing*), capacidade fagocitária, expressão de mediadores inflamatórios e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Indução de Diabetes Mellitus (DM) e modelo de doença periodontal experimental

Foram utilizados 40 camundongos C57BL/6, machos, com peso inicial em média de 22g, com 5-6 semanas de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico microisoladoras, em estante apropriada para condições SPF (*Specified Pathogen Free*), em ambiente com temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e foto-período (ciclos 12:12 horas claro/escuro) controlados. O protocolo de estudo foi submetido para aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo, Brasil, e seguiu as recomendações do *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* (Anexo A).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: “Controle” (n=13): grupo controle sem indução do DM e “Diabetes” (n=12): grupo com indução de DM. O diabetes mellitus experimental foi induzido através da administração de estreptozotocina (STZ), em dose única^{6, 56}, na concentração de 150mg/Kg de peso corporal. A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio 0,1M (pH 4,5) e os animais receberam a quantidade da solução preparada via intraperitoneal de acordo com o seu peso. Animais do grupo controle receberam injeção apenas do mesmo volume do tampão utilizado na diluição da STZ. Após 72 horas foram coletadas amostras de sangue por punção da cauda para determinação da glicemia utilizando glicosímetro portátil digital (Advantage).

Após a constatação do estabelecimento do DM (glicemia igual ou acima de 250mg/dL)¹⁰⁵, todos os animais foram mantidos em biotério por 5 semanas para “cronificação” da condição de diabetes. A doença periodontal foi experimentalmente induzida após 2 semanas da constatação do diabetes experimentalmente induzido nos camundongos do grupo DM. Neste protocolo de indução os animais foram submetidos à anestesia inalatória e uma injeção com 3 μL de uma suspensão de $1 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ de *Pg* (*Porphyromonas gingivalis*), inativados por calor, nos tecidos gengivais palatinos bilateralmente, na região de molares. Os animais do grupo controle receberam injeção do mesmo volume do veículo nos tecidos gengivais. Este protocolo foi realizado 3 vezes por semana, durante 3 semanas totalizando 5 semanas de indução de ambas as doenças.

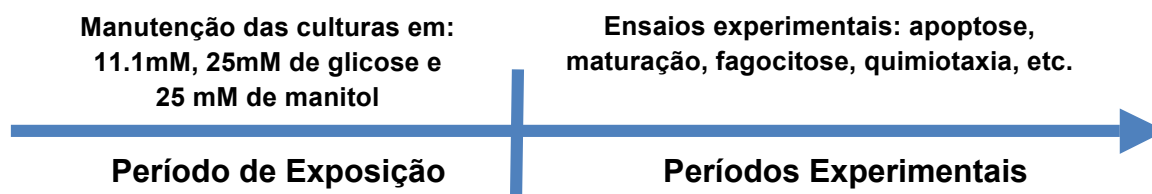
Ao final deste período, os animais foram anestesiados com de cloridrato de quetamina (50 mg/ml -Ketalar, Parke-Davis, Brasil) e xilazina (20 mg/ml – Rompum, Bayer, Brasil), na concentração de 200 µL para cada 100 g de peso corpóreo seguido da eutanásia por choque hipovolêmico, uma vez que, o coração foi exposto para punção do ventrículo direito e coleta de sangue. A glicemia de todos os animais foi novamente checada com o glicosímetro imediatamente antes do sacrifício. Os linfonodos cervicais foram coletados bilateralmente para análise do *homing* das células dendríticas.

4.2 Cultura celular

Foi utilizada uma linhagem murina (camundongos) de células dendríticas (DC2.4) obtida do Dr. Kenneth L. Rock (University of Massachusetts, Boston, MA, USA) por meio de acordo de transferência de material (*material transfer agreement*, MTA). Esta linhagem foi descrita originalmente por Shen et al.⁸⁶ (1997). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640/HEPES (“glicose normal”, 11.1mM (ThermoFisher Scientific, cat# 72400047) suplementado com antibióticos (penicilina/streptomicina, 10.000UI/100 ug/mL, respectivamente), 55 µM de beta-mercaptoetanol (Gibco/ThermoFisher Scientific, cat# 21985-023), 2 mM L-glutamina (Cellgro, cat# 25015-ce) aminoácidos não-essenciais (Gibco/ThermoFisher Scientific, cat# 11140-050) e soro fetal bovino (Gibco/ThermoFisher Scientific, cat# 1600-044) inativado por calor (10% vol:vol) em incubadora de CO₂ (37C, 5% CO₂, 90% de umidade).

Considerando que a exposição à elevada concentração de glicose por período curto de tempo (até 24 h) não apresenta efeitos marcantes (dados do estudo-piloto, não apresentados) e também o estado crônico da exposição às elevadas concentrações de glicose na condição de diabetes in vivo, em todos os experimentos subsequentes as células foram inicialmente expostas à concentração de “alta” glicose por período de 3 dias previamente aos experimentos, sendo este período inicial denominado “período de exposição” (ver Figura 1, abaixo). Em todos os experimentos, utilizou-se 25 mM como alta concentração de glicose (Sigma-Aldrich, cat# G6152) e 11.1mM como concentração normal de glicose. Manitol (Sigma-Aldrich, cat# M4125) 25 mM foi utilizado como controle osmótico em experimentos selecionados. Todos os experimentos foram repetidos, de forma independente, por um número mínimo de três vezes.

Figura 1 - Esquema ilustrativo do procedimento experimental proposto: as células dendríticas foram expostas às condições de cultura com diferentes concentrações de glicose por 3 dias (período de exposição) PREVIAMENTE à sua efetiva utilização nos diferentes experimentos propostos



Fonte: Elaboração própria.

4.3 Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada por até 72 h, com contagens realizadas nos períodos de 24, 48 e 72 h. Neste experimento *não houve período de exposição* das células, uma vez que experimentos-piloto demonstraram que a exposição à elevada concentração de glicose por períodos superiores a 5 dias resultava em taxa de morte celular acima de 90%. As células foram contadas, resuspendidas em meio contendo 2.5% de FBS e plaqueadas em placas de cultura de 12 poços ($1,5 \times 10^4$ células/poço). Nas primeiras 4 h as células foram mantidas em meio RPMI contendo a concentração de glicose normal (11.1 mM) para que ocorresse a adesão celular e recuperação do processo de dissociação enzimática do substrato de cultura. Após este período inicial de 4 h, o meio de cultura foi removido por aspiração, as células lavadas gentilmente com PBS, e foi acrescentado o meio de cultura contendo as diferentes concentrações de glicose (11.1 mM ou 25 mM) ou de manitol (25 mM) como controle osmótico. Como controles positivo e negativo foram utilizados, respectivamente, maior concentração de FBS (10% vol:vol) e mitomicina (10 ug/mL, Sigma-Aldrich, cat# M4287-2MG). Ao final de cada período experimental, o meio de cultura contendo células em suspensão foi coletado e combinado às células dissociadas enzimaticamente (Tryple Express, Invitrogen/ Gibco/ThermoFisher Scientific, cat# 12604-021) do substrato de cultura. A proliferação celular foi avaliada por contagem manual direta em hemocítômetro das células viáveis, pelo ensaio de exclusão de azul de trypan (Trypan blue dye stain, Gibco/ThermoFisher Scientific, cat# 15250061). A viabilidade celular foi calculada a partir do número total de células presente (incluindo células viáveis e não viáveis). Estes

experimentos foram realizados em duplicata e repetidos quatro vezes de forma independente, utilizando passagens celulares distintas.

4.4 Ensaio de apoptose

A susceptibilidade das DCs à apoptose foi avaliada no período de 8h após estímulo com Camptotecina (Sigma-Aldrich, cat# C9911) utilizada como agente indutor de apoptose. Após o *período de exposição* às concentrações de glicose elevadas e normais por 3 dias, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 60 mm (1×10^6 células/placa) nas mesmas condições de glicose do período de exposição; e após 4 h (para aderência celular e recuperação do processo de dissociação enzimática) foram estimuladas com Camptotecina (30uM) para indução de apoptose. Os controles foram preparados utilizando a mesma quantidade de células provenientes das mesmas placas (i.e., mesma passagem) de 100 mm utilizadas no período de exposição, porém estimuladas com o mesmo volume de DMSO como controle-veículo.

Ao final do período de estímulo de 8 h, as células foram coletadas e o percentual de células apoptóticas foi determinado em citômetro de fluxo utilizando ensaio de anexina / 7-AAD (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I – BD Biosciences, cat# 559763), segundo as instruções do fornecedor dos reagentes. Previamente a utilização do kit de anexina/7-AAD citado acima, as células foram marcadas com o corante vital Fixable Viability Stain 520 (BD Bioscience cat# 564407). Brevemente, as células foram coletadas com reagente enzimático (Tryple Express, cat# 12604-021, Gibco/ThermoFisher Scientific), resuspendidas em 1 mL DPBS com 1×10^6 células. Para esse volume foi adicionado 1 μ L do corante vital e incubado por 15 min em temperatura ambiente (25°C) protegido da luz. Após a incubação as células foram lavadas com 2%FBS em D-PBS, e posteriormente contadas e alíquotas de 1×10^5 células resuspendidas em 500 uL de tampão de ligação foram marcadas simultaneamente com Anexina V (5 μ L) conjugada ao fluoróforo PE (indicativo da inversão da fosfatidilserina da porção citoplasmática para a porção externa da membrana plasmática e representativo de apoptose inicial) e 7-AAD (5 μ L) (reagente com afinidade para DNA dupla fita e indicativo da perda de integridade das membranas plasmática e nuclear, representativo da fase final / tardia da apoptose). As marcações foram realizadas por 15 min, à 25°C e ao abrigo da luz. Os dados foram adquiridos e analisados em citômetro de fluxo, inicialmente definindo a população P1 com exclusão de debris celulares em dot-blot FSC x SSC. A população P2 foi definida dentro da população P1 a partir de dot-

blot FSC-A x FSC-W para a exclusão de *doublets*. A população P2 foi então visualizada em dot-blot PE (FL2) x PerCP-Cy5 (FL3), com a segregação dos eventos neste gráfico em quadrantes (ajustados a partir dos controles negativo - células não marcadas, positivo para PE - células marcadas apenas com Anexina v-PE e positivo para PerCP-Cy5 - células marcadas apenas com 7-AAD). Para cada amostra, foram adquiridos um mínimo de 10.000 eventos, e foram realizados três experimentos independentes utilizando passagens distintas de células. Utilizamos o citômetro BD FACSVerse (BD Biosciences) e o software do próprio equipamento (BD FacSuite, BD Biosciences) para as análises.

4.5 Maturação/ativação de células dendríticas

Nesse ensaio utilizamos apenas a exposição à alta concentração de glicose (25mM) e manitol (25mM), como controle osmótico. As células foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas em placas de 60 mm (5×10^5 células/placa) nas mesmas condições de cultura (glicose alta, normal ou manitol). A maturação das células dendríticas foi induzida estímulo com 1 ug/mL de LPS *E. coli* (serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich, cat# L4130) por 18h. Ao final deste período as células foram coletadas com reagente não enzimático, lavadas em PBS e contadas em hemocitômetro, fixadas em paraformaldeído 4% (BD Cytofix, cat# 554655, BD Biosciences), resuspendidas em tampão de marcação (1×10^5 células / 500 uL) e marcadas com anticorpos primários conjugados à diferentes fluoróforos para a detecção de CCR7 (PerCP.Cy5) e CD86 (PE) (cat# 560812 e 553692, respectivamente, BD Biosciences) por 30 min à 25 C e ao abrigo da luz. Os controles negativos foram incubados com as mesmas concentrações de anticorpos irrelevantes dos mesmos isotipos conjugados aos mesmos fluoróforos. Após duas lavagens em PBS para remoção de anticorpos livres, as células foram resuspendidas em tampão de marcação (1% FBS em D-PBS) e os dados de fluorescência nos canais FL2/FL3 referentes ao pico de emissão de cada fluoróforo foram adquiridos em citômetro de fluxo (BD FACSVerse, BD Biosciences) e analisados com o software do próprio equipamento (BD FacSuite, BD Biosciences). Para esta análise, foi definida a população P1, excluindo debris celulares em um dot-blot FSC - SC. A população P2 foi definida na população P1, excluindo doublets em um dot blot FSC-A x FSC-W. Na população P2 foram avaliados os percentuais de células positivas para cada marcador por meio de histogramas de intensidade de fluorescência (canais FL2/FL3) x tempo. Em cada amostra nestes experimentos foram adquiridos um mínimo de 10.000 eventos; e

foram realizados três experimentos independentes utilizando passagens celulares distintas.

4.6 Modulação da expressão gênica (RNA_m)

A análise da modulação da expressão gênica foi realizada para complementação da análise da maturação e ativação das células dendríticas, em virtude das dificuldades (não antecipadas) com os experimentos de citometria. As células foram submetidas ao **período de exposição de 3 dias** à glicose normal e à alta concentração de glicose e posteriormente plaqueadas, nas mesmas condições utilizadas no período de exposição, em placas de 12 poços (2×10^5 células por poço). Após 4 h para adesão e recuperação das células, foi realizado o estímulo com 100 ng/mL e 1 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich, *E. coli* serotype 0111:B4, cat# L4130) por 18 horas para indução da maturação (de forma similar ao realizado para o ensaio avaliando a maturação por citometria). Ao final do período de estímulo de 18 h, o RNA total foi extraído utilizando sistema de colunas de afinidade (Genlute, total RNA purification kit, cat# RNB100, Sigma-Aldrich Co.) e quantificado em espectrofotômetro de microvolumes (NanoVue Plus, GE Healthcare), considerando uma relação A260/A280 entre 1.8 e 2.1 como indicativa da pureza do RNA obtido. O cDNA foi sintetizado utilizando random hexamers como primers por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat# 4368813, Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. O PCR em tempo real foi realizado com 2 µL do produto da reação de síntese de cDNA utilizando reagentes TaqMan (TaqMan Fast Advanced master mix, cat# 4444556 Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific) e pares de primers e sonda pré-desenhados e otimizados (TaqMan Fast Gene Expression Assays, Applied Biosystems) para detecção dos seguintes genes alvo: IL-6, IL-10 e TNF- α , além do gene constitutivo GAPDH utilizado para normalização dos resultados. Estas reações foram feitas em volume total de 20 µL em termocicladora StepOnePlus (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) e os resultados analisados pelo método delta(deltaCt) utilizando o software da própria termocicladora.

4.7 Ensaio para avaliação da atividade fagocitária

Nestes experimentos utilizamos o *período de exposição* de 3 dias à glicose normal e elevada. Após o período de exposição, as células foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^5 células/poço) nas mesmas concentrações de

glicose utilizadas no período de exposição. Após 18 h para adesão e recuperação celular, e também para a ativação com 1 µg/mL LPS (*E. coli*, serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich, cat# L4130), iniciamos o experimento para avaliação da atividade fagocitária utilizando partículas de *Escherichia coli* marcadas de forma covalente com o fluoróforo phrodo (phRodo Red *E. coli* Bioparticles, cat# P35361, Molecular Probes/Life Technologies), com características de excitação e emissão similares ao fluoróforo TexasRed. Brevemente, as partículas bacterianas conjugadas ao fluoróforo foram resuspendidas em tampão PBS segundo as instruções do fornecedor (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific), e um volume de 100 µL desta suspensão foi acrescentado aos poços contendo as células dendríticas por 2 h, representando uma proporção de partículas bacterianas : células de 10:1. O fluoróforo conjugado a estas partículas emite fluorescência no espectro vermelho ao ser excitado pela luz UV apenas se o pH estiver abaixo de 6.0. Assim apenas partículas bacterianas efetivamente fagocitadas e incluídas nos lisossomos (onde o pH é reduzido) do citoplasma das DCs foram visualizadas. Ao final das 2 h, as células foram lavadas gentilmente com PBS 2 vezes, fixadas em paraformaldeído 2.5% e permeabilizadas em tampão contendo saponina (BD Cytotfix/Cytoperm, cat# 554714, BD Biosciences). Foi utilizada faloidina conjugada à AlexaFluor488 na concentração de 5 µg/mL por 40 min à 25 C e ao abrigo da luz para marcação da actina do citoesqueleto celular para possibilitar a visualização das células. Em seguida, foi feita a marcação do núcleo celular com DAPI (Sigma-Aldrich Co., cat# D9542) na concentração de 0.5 µg/mL por 5 minutos à 25 C e ao abrigo da luz. As células foram observadas em microscópio de fluorescência invertido (EvoS *fl*, AMG Micro, magnificação de 100X) utilizando filtros verde (FITC/AlexaFluor 488), vermelho (phRodo/Texas Red) e azul (DAPI). Imagens digitalizadas em *overlay* dos três canais de fluorescência foram obtidas em três campos aleatórios em cada poço. Um examinador treinado realizou a contagem do número total de células e do número de células contendo partículas bacterianas em seu interior, determinando o percentual de células fagocitantes. Esta contagem foi realizada de forma cega para os grupos experimentais (glicose normal ou elevada). Estes experimentos foram realizados simultaneamente com três passagens diferentes das células dendríticas.

4.8 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Considerando que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um importante aspecto na maturação e atividade das DCs, estando envolvido na atividade

microbicida após a fagocitose e também na produção de mediadores inflamatórios, incluímos o ensaio para avaliar a influência de diferentes concentrações de glicose na produção de ROS. Para isso as células foram submetidas ao **período de exposição**, e posteriormente plaqueadas em placas de 48 poços (1×10^5 células por poço) nas mesmas condições de cultura do período de exposição. Após 4 h para adesão e recuperação das células, o meio de cultura foi removido, as células lavadas gentilmente com PBS por 2 vezes e foi acrescentado um volume de 250 μ L de PBS contendo 10 μ M do reagente 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (cat# C400, Molecular Probes/ThermoFisher Scientific). Após incubação à 37°C por 1h para internalização do reagente, este foi removido e substituído por meio de cultura (nas mesmas condições do período de exposição contendo 10% FBS) por mais 1 h para recuperação das células. Foi então realizado o estímulo com 50 ng/mL de forbol myristil-acetato (PMA, Sigma-Aldrich, cat# P8139) por 15 minutos para indução da produção de ROS. Na presença de ROS no meio intracelular, o reagente 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate sofre oxidação e passa a emitir fluorescência no canal “verde” (FITC/FL1) quando excitado por luz UV ou pelo laser azul do citômetro (488 nm), enquanto nas células que não produziram ROS não ocorre a oxidação do reagente e não há emissão de fluorescência com a excitação das células. A aquisição dos dados foi realizada em um mínimo de 30,000 eventos por amostra em citômetro de fluxo (BD FACSVerse, BD Biosciences). Inicialmente foi definida a população P1 excluindo debris celulares em dot-plot FSC x SCC. A população P2, excluindo *doublets*, foi definida a partir da população P1 em dot-plot FSC-W x FSC-A. Nesta população P2, foi determinado o percentual de células positivas para FITC, bem como a intensidade da fluorescência (representativa da extensão da oxidação do reagente 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, a qual é proporcional à quantidade de ROS produzido intracelularmente) em dot-plots da intensidade da fluorescência no canal FL1(FITC) x FSC. Estes experimentos foram realizados simultaneamente com três passagens diferentes das células dendríticas.

4.9 Ensaio de quimiotaxia/ migração

Após o **período de exposição** (3 dias) à glicose normal ou elevada, 1×10^6 células foram plaqueadas em placas de 60 mm nas mesmas condições utilizadas no período de exposição. Após 4 h para adesão e recuperação celular, foi realizado o estímulo com 1 μ g/mL de LPS (*E coli*, serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich, cat# L4130)

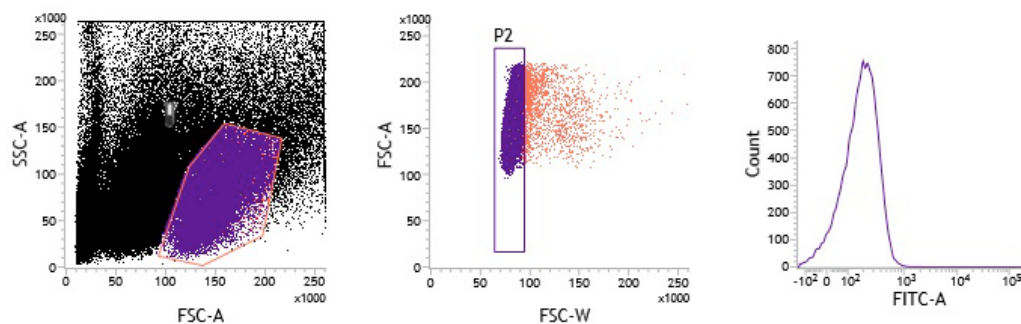
por 18 h. Ao final deste período de ativação/maturação, as células foram tripsinizadas, lavadas em PBS e contadas em hemocítmetro. A concentração de células foi ajustada para 6×10^4 células/mL em meio de cultura contendo 1% de FBS e as mesmas condições de concentração de glicose utilizadas desde o período de exposição. Desta suspensão de células, 500 μ L (3×10^4 células) foram transferidos para a câmara superior de transwells com poros de 3 μ m (Corning Transwell Permeable, cat. nº3462, Corning-Costar). Na parte inferior da câmara foi acrescentado 1.5 mL de meio de cultura (1% FBS e nas mesmas concentrações de glicose) contendo 200 ng/mL de CCL-19 (MIP-3b, cat# 250-27B Peprotech) como estímulo quimiotático. Como controle negativo, a parte inferior da câmara continha apenas 1.5 mL de meio de cultura (1% FBS e as mesmas condições de concentração de glicose). Após 24 horas a parte superior da membrana do *transwell* foi limpa com cotonete estéril embebido em PBS 1x para remoção das células que não migraram. Foi então realizada a fixação e permeabilização das células presentes na porção inferior das membranas por meio da imersão destas nos reagentes Fixation/Permeabilization solution e BD Perm/Wash™ Buffer, respectivamente, (kit BD Cytofix/Cytoperm, cat. nº 554714, BD Biosciences), segundo as instruções do fornecedor dos reagentes. As membranas foram removidas de seu suporte plástico com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e montada em lâminas com agente líquido contendo 0.5 μ g/mL de DAPI (Fluorescence mounting medium, cat# S3023 Dako) para avaliação em microscópio invertido de fluorescência (EvoS fl, AMG/Life Technologies). As células presentes na porção inferior da membrana (voltada para a câmara inferior do transwell, contendo o estímulo quimiotático) foram contadas em imagens obtidas na magnificação de 100X por examinador treinado e sem conhecimento dos grupos experimentais. Estes experimentos foram realizados três vezes de forma independente e utilizando passagens diferentes das células dendríticas.

4.10 Migração para os linfonodos in vivo

Para verificar a influência da exposição à elevada concentração de glicose e das condições/microambiente associado ao diabetes na migração de DCs para os linfonodos in vivo, inicialmente as células DC2.4 foram expostas à glicose elevada ou normal por 3 dias, sendo que nas últimas 18 h deste período foi acrescentado o estímulo com 1 μ g/mL de LPS (*E coli*, serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich, cat# L4130) para a ativação/maturação celular. As células foram marcadas com 10 μ M de CFSE (Sigma-Aldrich, cat#) por 8 min., segundo protocolo definido em experimento-piloto. Um total

de 1×10^6 células marcadas com CFSE foram ressuspensas em 50 μ L de PBS e administradas por injeção retro-orbital (sob anestesia dissociativa inalatória, complementada com anestesia local do globo ocular) em camundongos C57BL/6 com e sem indução de diabetes experimental e nos quais a doença periodontal foi induzida previamente pelo modelo de injeção de *P.gingivalis* inativados por calor (modelos experimentais descritos anteriormente). Após 24 h, os animais foram eutanasiados por choque hipovolêmico e os linfonodos cervicais foram dissecados e coletados. Os linfonodos foram macerados em PBS, as células liberadas passadas repetidas vezes em cell strainer de 70 μ m para resuspensão. A presença de células dendríticas DC2.4 nos linfonodos foi determinada por citometria de fluxo, por meio da análise do percentual de células marcadas com CFSE (emitindo fluorescência no canal “verde”/FL1) presentes nos linfonodos. Utilizamos o citômetro BD FACSVerse (BD Biosciences) e o software do próprio equipamento para as análises (BD FacSuite, BD Bioscience). A população de interesse, P1, foi definida em um dot-plot FSC x SSC para incluir células mononucleares maiores (excluindo linfócitos, de menor tamanho celular), em seguida a partir desta população P1 foi definida a população P2, com exclusão de *doublets*, em dot-plot FSC-A x FSC-W. Nesta população P2 foi determinado o percentual de células positivas para emissão de fluorescência no canal FL1 (FITC/CFSE) em histograma FL1 x número de eventos ('count'). Um mínimo de 200,000 eventos (em P2) foram adquiridos para cada amostra (ver Figura 2 abaixo). Estes experimentos foram realizados simultaneamente utilizando duas passagens distintas de DCs e um mínimo de 6 animais/grupo experimental (diabetes/ com doença periodontal, sem diabetes/com doença periodontal).

FIGURA 2 – Estratégia de análise/aquisição dos dados no citômetro no experimento de migração para os linfonodos (“*homing*”) in vivo por meio da detecção de células DC2.4 marcadas com CFSE presentes nos linfonodos cervicais 24 h após a injeção retroorbital em camundongos com doença periodontal induzida.



Fonte: Elaboração própria.

4.11 Análise estatística

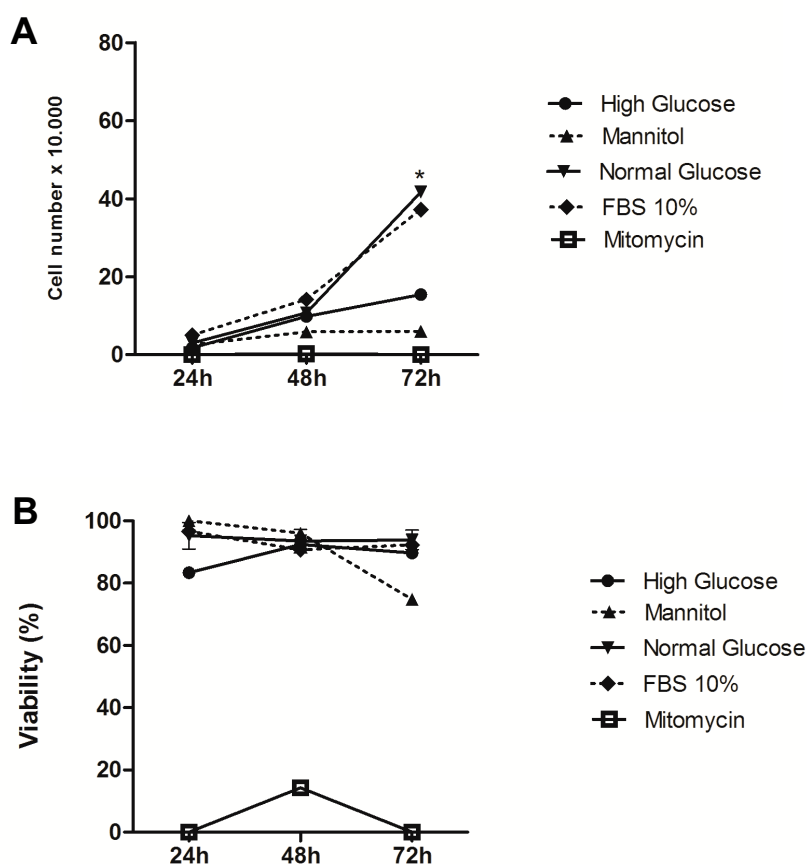
A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram inicialmente avaliados quanto à natureza da distribuição com o teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Médias e desvios-padrão foram obtidos a partir dos dados dos experimentos. Foram utilizados ANOVA seguido de Tukey para comparações pareadas, bem como o teste t não pareado de Student, sempre com correção de Welch para desigualdade de variâncias devido ao limitado número de pontos para análise (na maior parte dos experimentos, havia três ou quatro pontos de dados derivados de experimentos independentes para análise). Os experimentos realizados simultaneamente com passagens distintas de células foram considerados independentes, uma vez que os resultados de um experimento com uma determinada passagem não tem qualquer influência sobre os resultados do mesmo experimento com outra passagem de células. O objetivo central da análise foi avaliar a possível influência da elevada concentração de glicose nos diferentes desfechos de interesse. O nível de significância estatística estabelecido para todas as análises foi de 95% ($p < 0.05$).

5 RESULTADO

5.1 Proliferação e Viabilidade

Foi avaliado a proliferação e viabilidade da linhagem murina de células dendríticas (DC2.4) através do ensaio de exclusão de azul de trypan. A contagem de células foi realizada manualmente com a utilização de câmara de Neubauer. Os resultados indicam que a proliferação, mas não a viabilidade, desta linhagem celular é influenciada pela variação da tensão osmótica do meio de cultura, uma vez que tanto a alta concentração de glicose, bem como o controle osmótico (manitol) inibiram a proliferação celular, como demonstra a Figura 3.

Figura 3 – Gráfico (A) demonstra que a proliferação, mas não a viabilidade (Gráfico B), das células de linhagem murina DC2.4 é afetada por variações na tensão osmótica do meio de cultura. * indica $p < 0.001$ para o número de células presentes no meio contendo concentração normal de glicose no período de 72 h em comparação aos demais grupos experimentais (ANOVA realizado para cada período experimental, seguido do teste de Tukey).

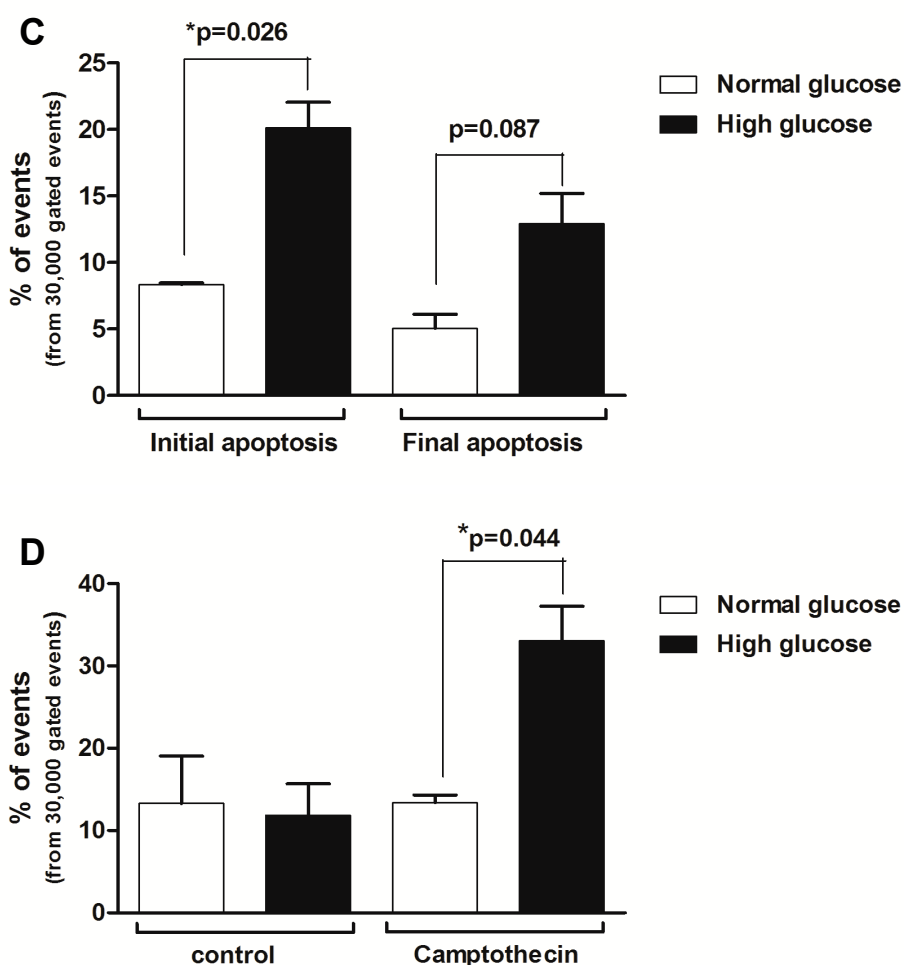


Fonte: Elaboração própria.

5.2 Apoptose

A exposição à elevada concentração de glicose (25 mM), isoladamente, não induziu apoptose nas DC2.4; no entanto as células previamente expostas à elevada concentração de glicose mostraram-se mais sensíveis ao estímulo indutor de apoptose Camptotecina (com significativo aumento da proporção de células em apoptose inicial e do total de células apoptóticas), indicando que a esta exposição a alta concentração de glicose pode favorecer a apoptose induzida das células dendríticas (Ver Figura 4).

Figura 4 – Gráfico (C) demonstra o percentual apoptótico inicial e final e (D) o percentual apoptótico total das células de linhagem murina DC2.4 induzida por estímulo de 8 h com Camptotecina (6 uM, Sigma-Aldrich), segundo a condição de cultura nas 72 h prévias ao estímulo (glicose normal, “Normal glucose”, 11.1 mM; e glicose elevada, “High glucose”, 25 mM). *indicam o valor de p para a comparação entre os grupos experimentais unidos pelos bráquetes utilizando teste t não pareado com correção de Welch para desigualdade de variâncias.

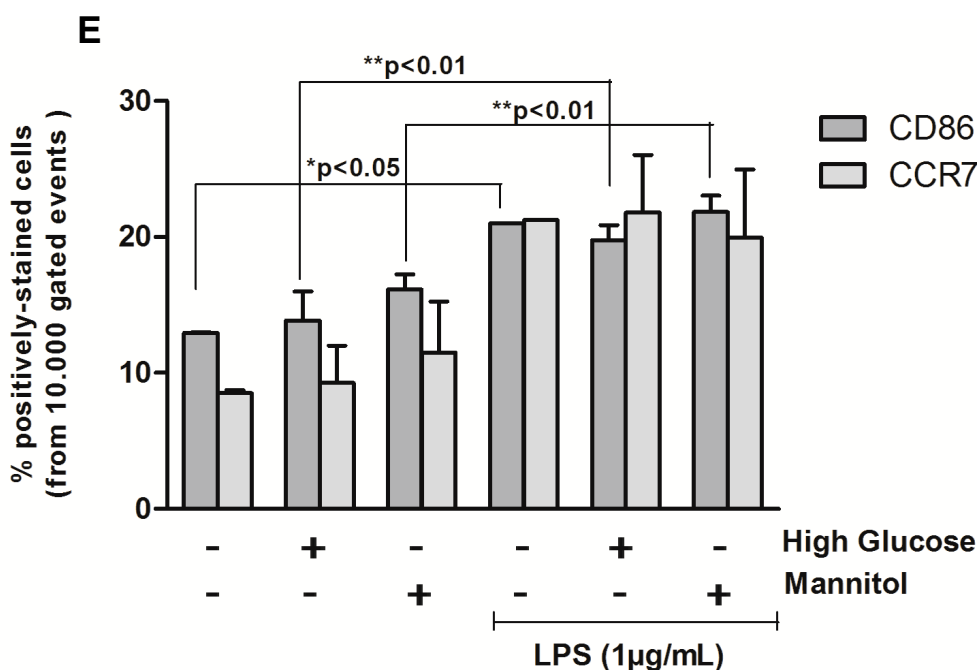


Fonte: Elaboração própria.

5.3 Maturação

O estímulo com LPS (1µg/mL) por 18 h foi capaz de promover a maturação das DC2.4, como indica o significativo aumento da expressão dos marcadores de ativação/maturação de CD86 e CCR7, no entanto a prévia exposição (por 3 dias) à elevada concentração de glicose ou ao controle osmótico, tanto isoladamente quanto na presença do estímulo com LPS, não afetaram a expressão destes marcadores, sugerindo que a concentração de glicose elevada não afeta o processo de ativação/maturação de células dendríticas induzido por LPS (Ver Figura 5).

Figura 5 – Gráfico (E) demonstra a proporção de células dendríticas de linhagem murina DC2.4 expressando os marcadores de diferenciação CCR7 (CCR7-PerCP-Cy5) e CD86 (CD86-PE), segundo a condição experimental. * e ** indicam as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais unidos pelos bráquetes (expressão tanto de CD86 quanto de CCR7), avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey.



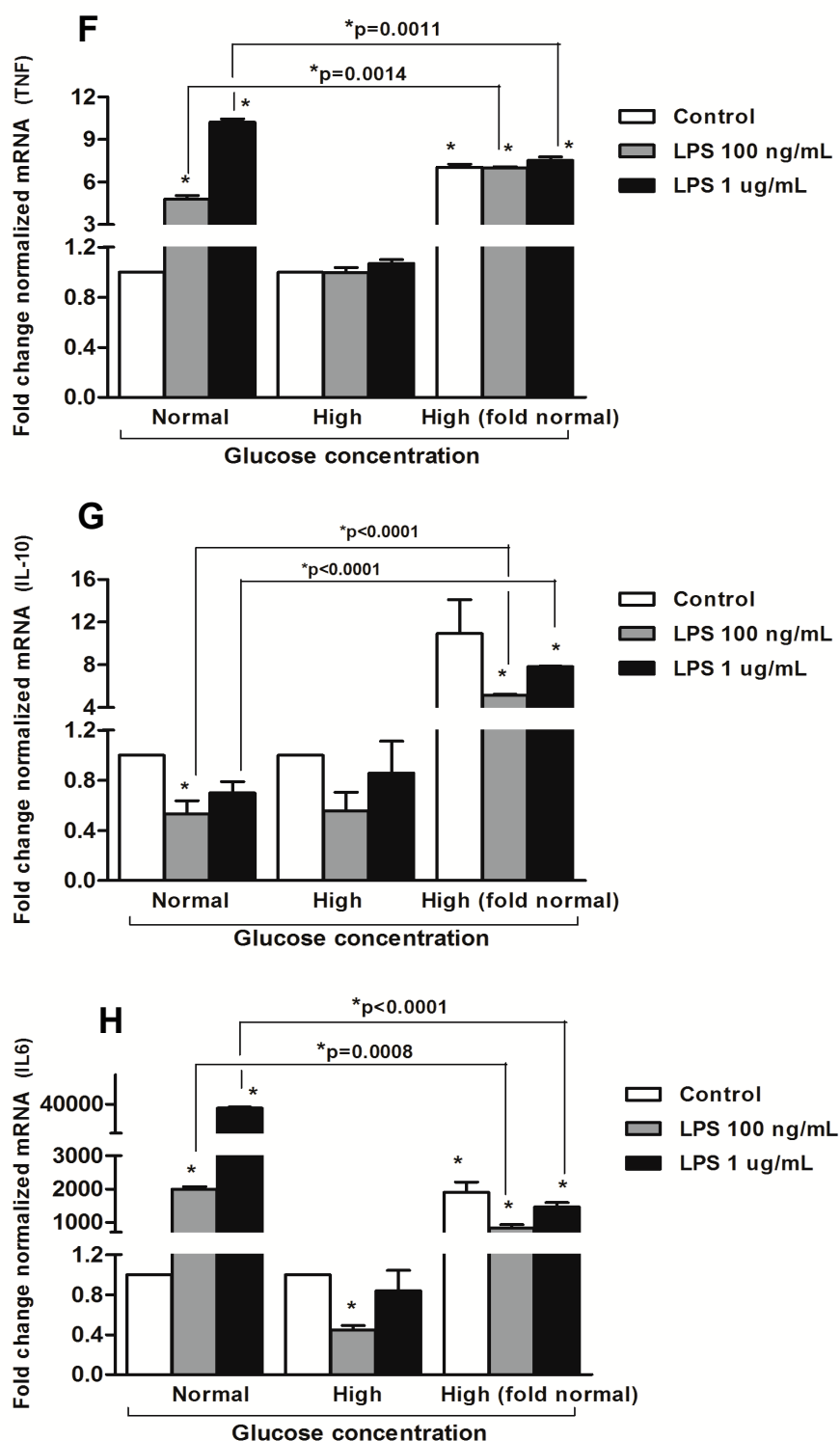
Fonte: Elaboração própria.

5.4 Expressão gênica (RNAm)

Como complementação da avaliação da influência da concentração de glicose sobre a maturação das células dendríticas, e considerando o insucesso na detecção de MHC-II por citometria, verificamos a influência da elevada concentração de glicose na expressão de genes de resposta imediata após 18h de estímulo com LPS. Estes

experimentos indicam um marcante e significativo efeito da elevada concentração de glicose na expressão gênica (RNAm) de TNF, IL-10 e IL-6 pelas DC2.4. A influência da elevada concentração de glicose foi tão marcante que obliterou a capacidade do LPS bacteriano induzir a expressão destes genes. O objetivo da análise foi verificar a regulação da expressão dos genes-alvo em relação ao controle não estimulado com LPS ('fold change'). Esta avaliação foi realizada em relação ao controle não estimulado de cada condição experimental (glicose normal ou glicose elevada) para avaliar o efeito da concentração de glicose na regulação da expressão dos genes-alvo. Também foi feita a normalização da expressão dos genes-alvo verificada na condição de alta concentração de glicose em relação ao controle não estimulado das células cultivadas em condições normais de glicose “High (fold normal)”, para avaliar o efeito da exposição à elevada concentração de glicose na expressão dos genes-alvo comparativamente às condições de glicose normal. Os experimentos foram realizados três vezes, de forma independente e utilizando passagens distintas das células (Ver Figura 6).

Figura 6 – Expressão gênica de resposta rápida representada pelos gráficos (F) TNF-alfa, (G) IL-10 e (H) IL-6 por células de linhagem murina DC2.4 expostas à glicose (“Normal”, 11.1 mM e “High”, 25 mM) por 3 dias previamente ao estímulo por 18 h com LPS (*E.coli*). * indica diferença significativa em relação ao valor “1” atribuído ao controle pelo “one-sample t test”, e as diferenças entre condições experimentais avaliadas por bráquetes foram avaliadas utilizando teste t não-pareado com correção de Welch para desigualdade de variâncias.

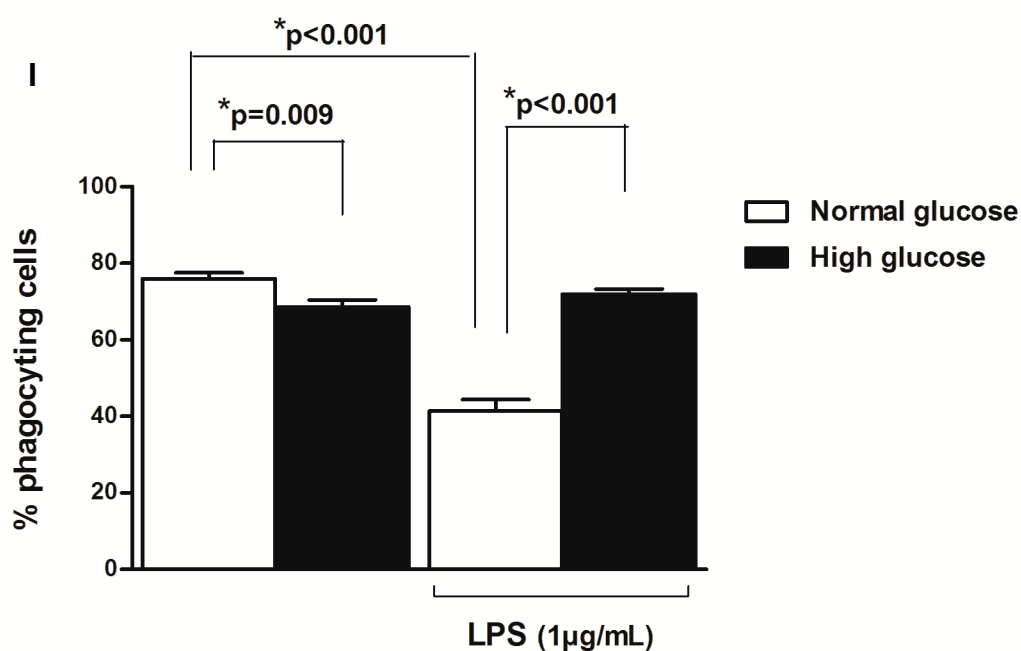


Fonte: Elaboração própria.

5.5 Atividade fagocitária

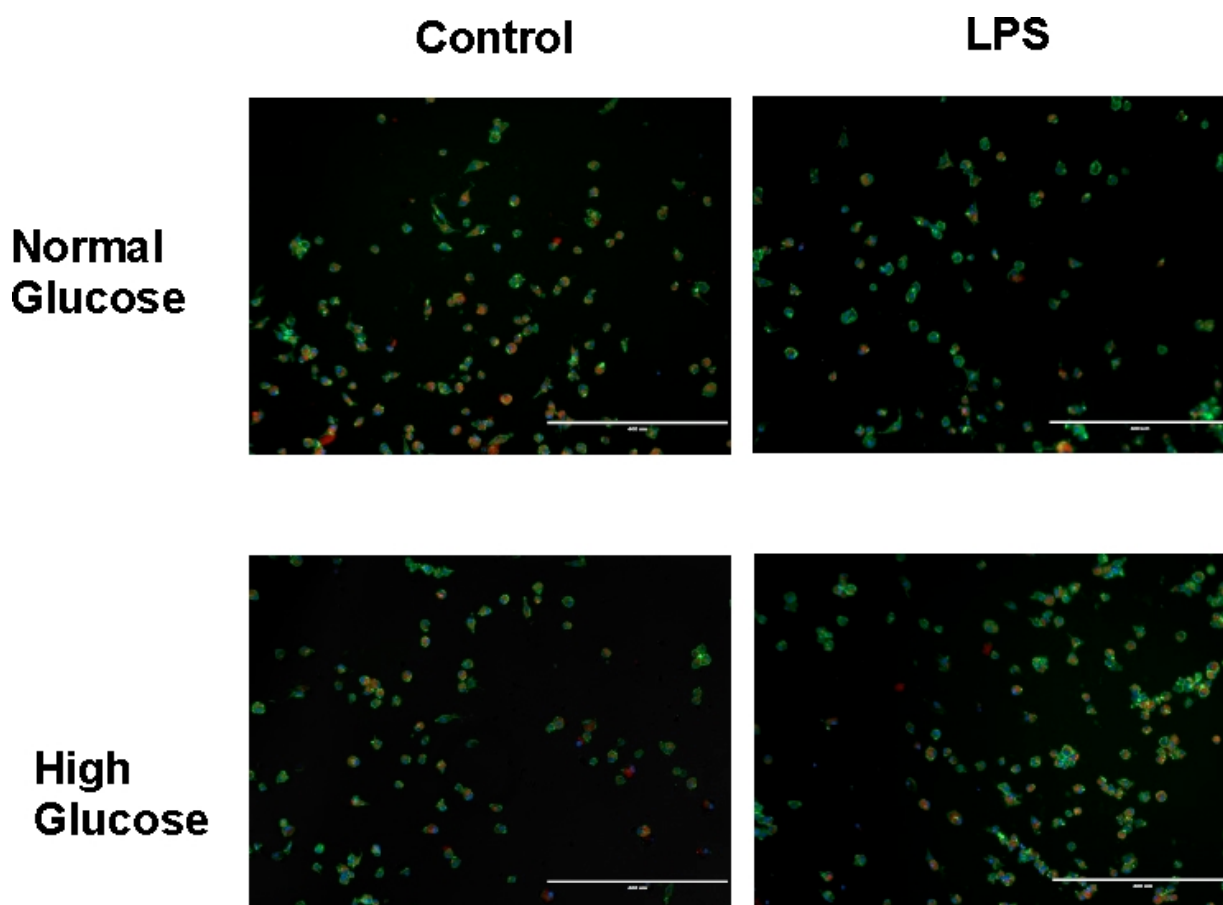
A atividade fagocitária de células dendríticas expostas à concentrações normais de glicose foi significativamente inibida pelo tratamento com LPS (1µg/mL) nas 18h prévias ao início do experimento. Esta inibição está relacionada à indução de maturação celular, com mudança do fenótipo; porém de forma interessante não foi observada nas células expostas à elevada concentração de glicose. A exposição à elevada concentração de glicose resultou em significativa (porém de reduzida magnitude) inibição da atividade fagocitária das DC2.4. No entanto, como a pré-ativação com LPS das células expostas à elevada concentração de glicose não influenciou a atividade fagocitária, esta se mostrou significativamente maior em comparação às células cultivadas em condições de concentração normal de glicose (Ver Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Gráfico (I) representa a atividade fagocitária das células de linhagem murina DC2.4 expostas à diferentes concentrações de glicose e com e sem pré-ativação com LPS. *Indica o valor de p para as comparações entre os grupos experimentais unidos pelos bráquetes com o teste t com correção de Welch para desigualdade de variâncias.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Foto ilustrativa da atividade fagocitária das células de linhagem murina DC2.4 expostas a diferentes concentrações de glicose, com e sem pré-ativação com LPS.

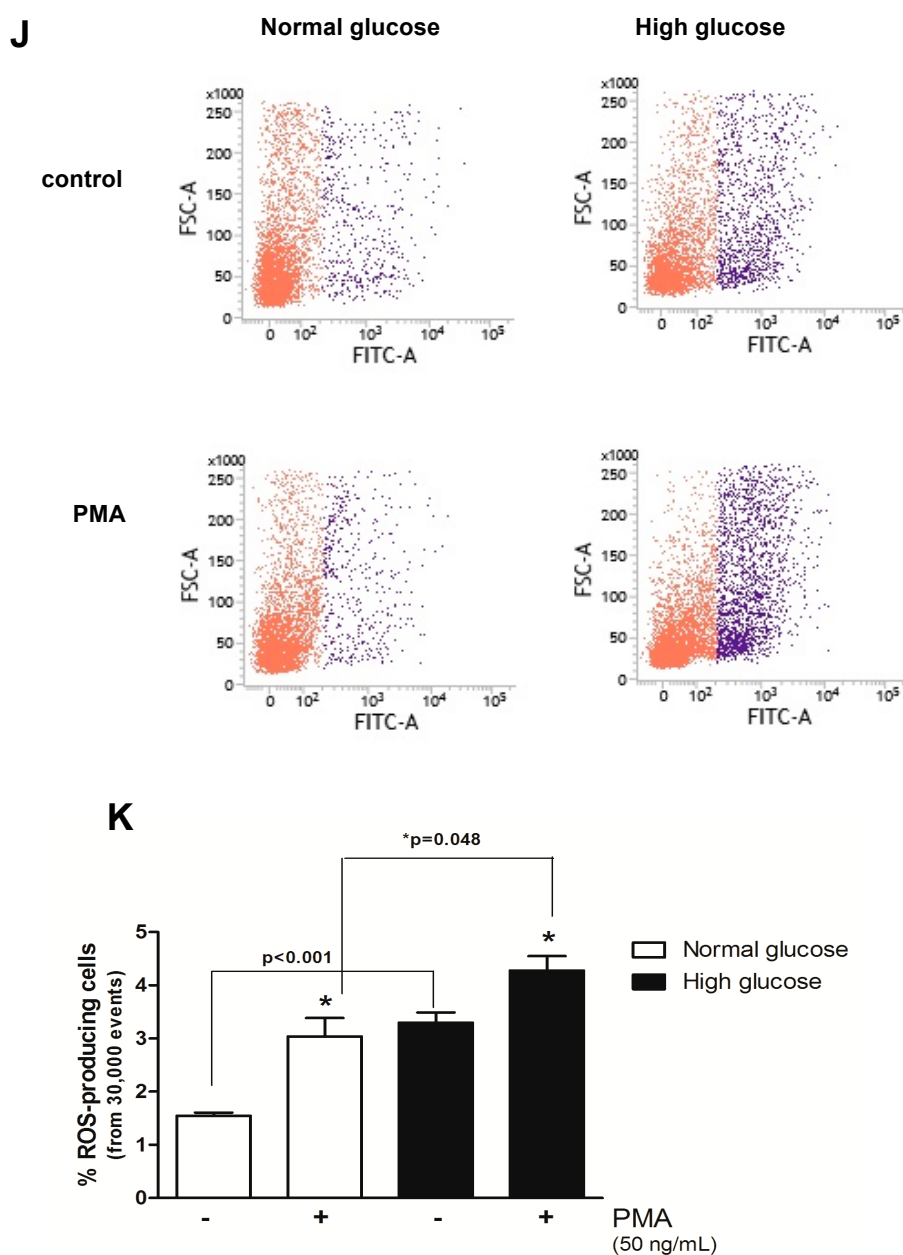


Fonte: Elaboração própria.

5.6 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

O estímulo com PMA aumentou a produção de ROS nas DC2.4, porém este aumento só foi significativo estatisticamente nas células cultivadas em concentrações normais de glicose. A exposição das DC2.4 à elevada concentração de glicose já resultou em significativo aumento da produção de ROS e o estímulo “adicional” com PMA resultou em discreto (e não significativo estatisticamente) incremento na produção de ROS em comparação às células não estimuladas com PMA. Interessante notar que a produção de ROS por DC2.4 expostas à alta glicose e estimuladas com PMA foi significativamente maior do que a produção de ROS das DC2.4 expostas à concentração normal de glicose e estimuladas com PMA. Este resultado indica que pode haver um efeito cumulativo dos estímulos do microambiente sobre o metabolismo oxidativo das DCs. Os experimentos foram realizados três vezes de forma independente e utilizando passagens diferentes das células dendríticas (Ver Figura 9).

Figura 9 – (J) Dot-blots representativos da produção de ROS detectada pelo oxidação do reagente 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate resultando na emissão de fluorescência no canal FL1/FITC, segundo a condição experimental (exposição à concentração de glicose normal ou elevada) e presença do estímulo para produção de ROS (PMA). Os eventos destacados na cor azul nos dot-blots são considerados 'positivos'. **(K)** Gráfico apresentando o percentual de células da linhagem murina DC2.4 produzindo ROS, detectadas por citometria de fluxo, segundo as condições experimentais (glicose normal ou elevada) e presença do estímulo com PMA. * indicam o valor de p para as comparações entre os grupos indicados pelos bráquetes utilizando o teste t com correção de Welch para desigualdade de variâncias. Dados do gráfico indicam média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados simultaneamente, utilizando passagens distintas da linhagem DC2.4.

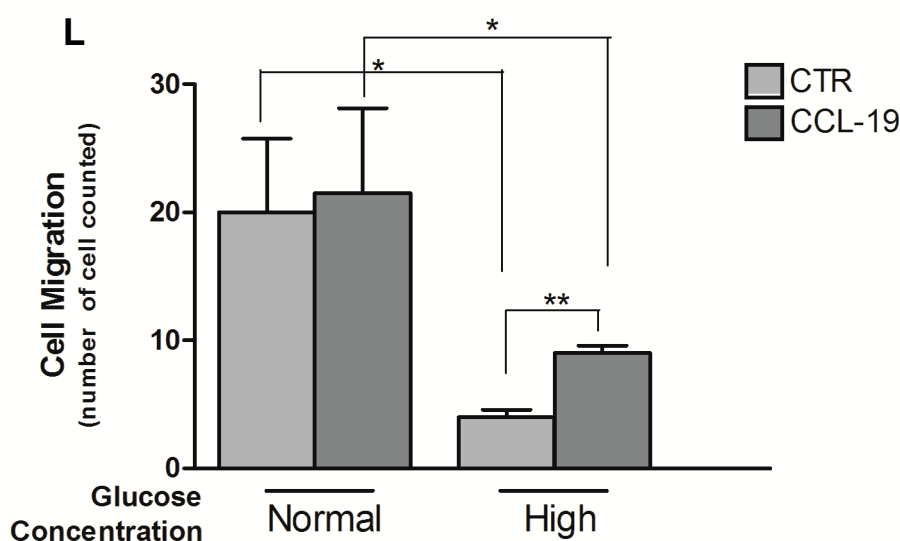


Fonte: Elaboração própria.

5.7 Quimiotaxia

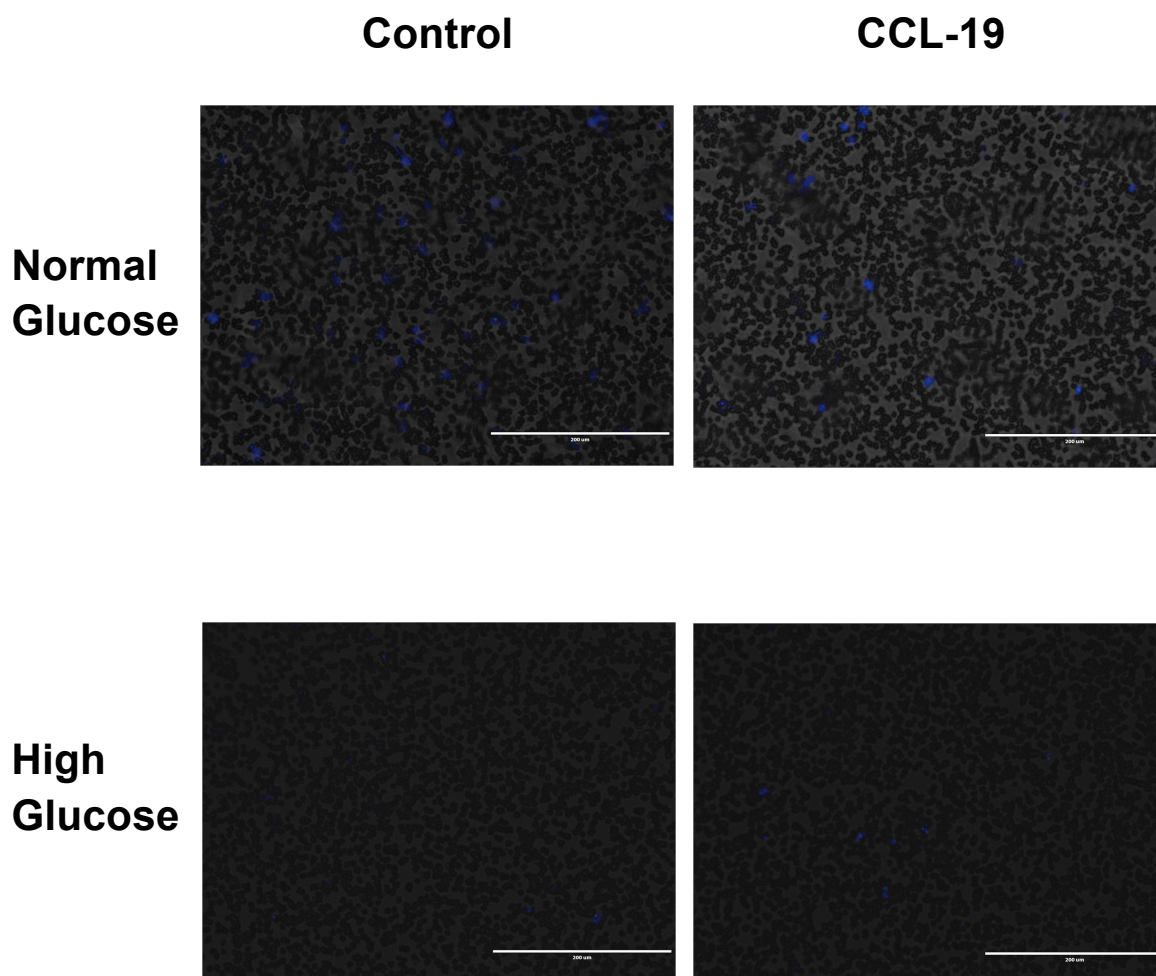
Os resultados do ensaio de quimiotaxia/migração indicam que o estímulo das DC2.4 cultivadas em condições de concentração normal de glicose com 200 ng/mL de CCL-19 não induziu aumento significativo da quimiotaxia. No entanto, quando cultivadas/expostas à elevadas concentrações de glicose, houve marcante inibição da quimiotaxia celular. Nestas condições (elevada concentração de glicose), as DC2.4 responderam ao estímulo com CCL-19 com aumento significativo da quimiotaxia, porém ainda em nível significativamente inferior ao observado para as células cultivadas em concentrações normais de glicose (Ver Figura 10 e 11).

Figura 10 – Gráfico (L) representa a quimiotaxia de células da linhagem murina (DC2.4), expostas a diferentes concentrações de glicose na presença e ausência do estímulo quimiotático. Na figura os dados são apresentados como média e desvio padrão do número de células contadas na parte inferior da membrana dos transwells, segundo a condição experimental. * indica $p < 0.01$ e ** indica $p < 0.001$ para as comparações entre os grupos unidos pelos bráquetes utilizando teste t com correção de Welch para desigualdade de variâncias.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 – Foto ilustrativa do ensaio de quimiotaxia das células de linhagem murina DC2.4 expostas a diferentes concentrações de glicose, com e sem pré-ativação com LPS.



Fonte: Elaboração própria.

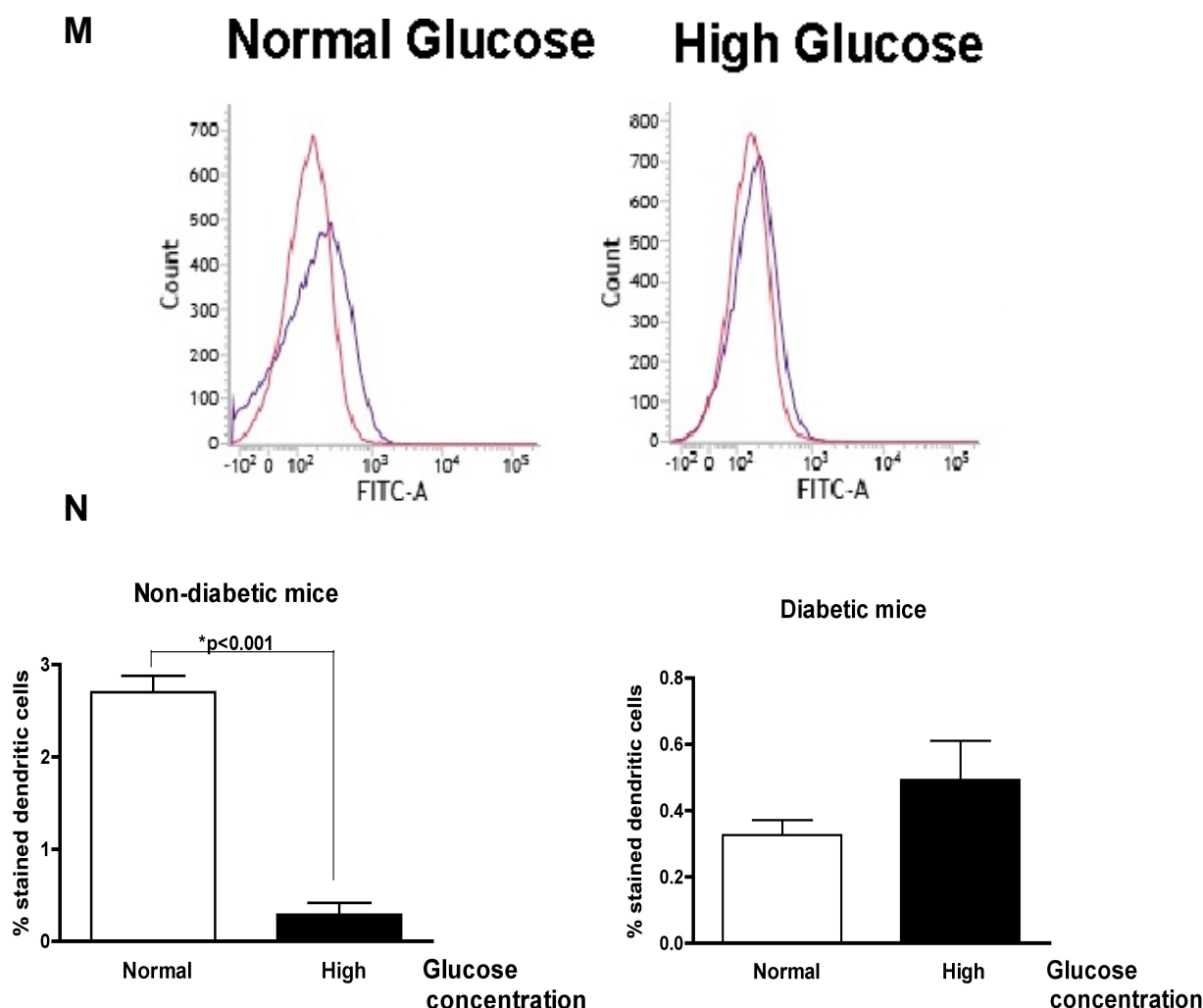
5.8 Migração DC 2.4 para os linfonodos in vivo

Neste experimento, avaliamos como a migração de DCs para os linfonodos in vivo é influenciada tanto pela exposição das DCs à alta glicose quanto pelo microambiente associado à condição de diabetes in vivo. Como estímulo ativador da resposta imune, induzimos doença periodontal experimental bilateralmente em animais diabéticos e não diabéticos.

Os dados obtidos indicam que a migração de DCs para os linfonodos cervicais é significativamente reduzida em animais diabéticos, independente da exposição das DCs à concentrações normais ou elevadas de glicose (notar a escala dos gráficos na Figura 10, B). Nos animais não diabéticos, a exposição das DCs à elevada concentração de glicose praticamente previniu a migração destas células para os linfonodos. Estes

resultados indicam que as condições do microambiente associado ao diabetes já inibe marcadamente o *homing* das DCs, em um efeito que é, em grande parte, associado à exposição à elevada concentração de glicose (Ver Figura 12).

Figura 12 - (M) Histogramas representativos da migração de células DC2.4 expostas à glicose normal ('Normal glucose') ou elevada ('High glucose') marcadas com CFSE para os linfonodos cervicais de camundongos com doença periodontal induzida experimentalmente. Os histogramas vermelhos são de amostras obtidas de linfonodos de animal não diabético, e os histogramas azuis são de amostras obtidas de linfonodos de animais diabéticos. **(N)** Gráficos apresentando média $\pm$ desvio padrão do percentual de células marcadas com CFSE (DC2.4) nas amostras de linfonodos cervicais de animais não diabéticos e diabéticos, segundo a condição experimental das células DC2.4 injetadas via retroorbital: exposição à glicose normal ou elevada. * indica a diferença significativa entre os grupos unidos pelo bráquete segundo teste t com correção de Welch para desigualdade de variâncias.



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O efeito da hiperglicemia, decorrente do diabetes mellitus, têm sido estudado em diferentes células imunológicas e está intimamente associado ao desenvolvimento das complicações decorrentes desta doença. Neste estudo buscamos descrever a influência da alta concentração de glicose, característica fundamental do diabetes mellitus, sobre diversos aspectos da biologia de células dendríticas. O objetivo principal foi contribuir para o entendimento do papel da elevada concentração de glicose independentemente dos efeitos dos compostos glicosados e da ativação de RAGE; por isso realizamos os experimentos *in vitro*, uma vez que *in vivo* seria muito difícil excluir os efeitos diretos (via RAGE) e indiretos dos AGEs. Entre as limitações deste estudo está seu caráter descritivo, uma vez que como se trata de um estudo inicial não procuramos elucidar mecanismos biológicos associados aos efeitos da elevada concentração de glicose. No entanto, mesmo com as limitações de um estudo *in vitro*, consideramos que as informações derivadas podem ser úteis no entendimento da modulação da resposta imune no diabetes, condição associada tanto a menor resistência à infecção quanto a um estado inflamatório crônico.

A alta glicose pode influenciar a biologia de células mesangiais dos rins, reduzindo a proliferação de forma proporcional à concentração de glicose utilizada em 24% (25 mM de glicose)¹² a 35% (33.3 mM de glicose)⁹⁸. Este efeito não foi causado apenas pela hipertoncidade do meio com elevada concentração de glicose, uma vez que o controle osmótico (manitol), não resultou em inibição similar da proliferação celular. Importante destacar que nestes estudos, a concentração de glicose considerada “normal” foi de 5 mM. Esta variação nas concentrações utilizadas como “elevadas” e “normais”, bem como as diferenças nos tipos celulares devem ser consideradas na comparação aos nossos resultados. Observamos que a exposição à alta glicose (25mM) inibiu a proliferação das células dendríticas em comparação às condições de glicose normal (11.1mM), que é a concentração de glicose encontrada no meio de cultura RPMI1640 obtido comercialmente. Esta redução da proliferação associada à alta concentração de glicose não foi acompanhada de diminuição da viabilidade celular, semelhante ao relatado na literatura para células mesangiais¹², porém, no caso das células dendríticas não podemos excluir a possibilidade do efeito da osmolaridade do meio de cultura sobre a proliferação celular, uma vez que o manitol também inibiu a proliferação. Interessante notar que nas células dendríticas expostas ao manitol, além da inibição da proliferação,

houve redução da viabilidade celular, indicando mecanismos biológicos distintos para os efeitos dos diferentes tipos de açúcares. Especulamos que a elevada concentração de glicose pode interferir no metabolismo energético da célula, afetando o ciclo celular; enquanto que a elevada concentração de manitol pode ser citotóxica, causando redução da proliferação pela indução de morte celular.

Outro aspecto metodológico variável que dificulta a comparação dos nossos resultados com a literatura é o tempo de exposição às diferentes concentrações de glicose. Os trabalhos mostram uma variação de 24 horas a 10 dias no tempo de exposição à glicose^{12, 65, 71, 98}. Nosso tempo de exposição foi baseado nos resultados do estudo piloto que mostraram uma diminuição significativa na viabilidade das células dendríticas de linhagem murina 2.4 quando expostas 5 e 7 dias à alta concentração de glicose (dados não demonstrados).

Apesar destas diferenças metodológicas, consideramos que a alta concentração de glicose pode influenciar a biologia celular de qualquer tipo de célula eucariótica de duas maneiras: 1. alterando o equilíbrio energético/metabólico pelo aumento da produção glicolítica de ATP; e 2. pelo estresse hiperosmótico^{42, 67, 77}.

A hiperosmolaridade hiperglicêmica é uma condição patológica caracterizada pela severa hiperglicemia e elevação da osmolaridade plasmática, encontrada geralmente em pacientes com diabetes mal controlado. Essa condição pode levar a um aumento do estresse oxidativo, associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)²³.

O aumento da produção de ROS no DM tipo 2 está associado ao processo de resistência à insulina, com maior dificuldade de controle metabólico do DM, representado pela hiperglicemia persistente²⁸.

Estudos realizados em diferentes tipos celulares^{12, 15, 65, 98} como células mesangiais, adiposas derivadas de células tronco, dendríticas, indicam que a alta glicose está associada ao aumento na produção de ROS e também de outros produtos derivados do estresse oxidativo. Especificamente em células dendríticas, a exposição a 30 mM de glicose por 24 horas, aumentou a produção de ROS⁶⁵, de forma similar aos nossos resultados. O efeito da hiperglicemia na produção de ROS em células dendríticas é dependente da ativação da p38 MAPKinase (MAPK)⁶⁵. Outras vias de sinalização intracelular podem estar envolvidas na regulação do estresse oxidativo, incluindo: NF- κ B (fator nuclear kappa B), JNK MAPkinase e proteína quinase C (PKC), as quais são ativadas por estímulos de estresse celular e também *downstream* do receptor de

produtos finais da glicação avançada (RAGE)³¹. Entretanto, a hiperglicemia pode ser o estímulo desencadeante inicial indutor do aumento da produção de ROS, amplificado em uma complexa rede de eventos que culminam na disfunção e dano celular⁷.

Recentemente foi relatado que o desequilíbrio da interação entre o sistema redox intracelular e o metabolismo da glicose está diretamente relacionado ao aumento da produção de ROS e descontrole metabólico do diabetes in vivo²⁸. Além da relevante ativação da sinalização via PI3-kinase/Akt e MAPkinases (p38, JNK e ERK), com seus efeitos biológicos diretos na produção de ROS, a regulação da via pentose fosfato (PPP - Pentose Phosphate Pathway) também é influenciada pela hiperglicemia e acentua o estresse oxidativo. Além disso, reciprocamente, o aumento da produção de ROS pode reprogramar a via metabólica de energia da glicólise, através da via PPP, levando ao aumento da produção de ácidos graxos livres, acúmulo de NADH e incremento da própria produção de ROS. Estes eventos levam à inibição do transporte de glicose para o meio intracelular por GLUT-4, caracterizando a resistência à insulina observada no modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 in vivo²⁸.

Além de atuar de maneira direta no aumento do estresse oxidativo, a alta concentração de glicose pode aumentar a apoptose das células dendríticas, como observamos nas células estimuladas com Camptotecina. Nossos achados estão de acordo com os de um estudo que avaliou a influência da hiperglicemia (25 mM por 48 h) na apoptose de células dendríticas primárias induzida por LPS³². É possível que o aumento da susceptibilidade à apoptose induzida por LPS e Camptotecina, em condições de elevada concentração de glicose, seja mediado por diferentes mecanismos. O LPS reduz a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em células dendríticas⁵⁵, além de inibir a ativação de Akt³²; enquanto a Camptotecina atua especificamente na DNA topoisomerase-I induzindo quebras no DNA genômico que resultam na modulação da proteína pró-apoptótica Bax e da proteína anti-apoptótica Bcl-2, causando a morte celular, além de interferir na permeabilidade da membrana mitocondrial^{49, 72}.

Nosso estudo também buscou investigar a influência da alta glicose na maturação/ativação das células dendríticas de linhagem murina. Para isso, avaliamos a expressão de CD86 e do receptor de quimiocina CCR7 como marcadores de maturação das DCs. CCR7 está envolvido no processo de ativação e migração das células dendríticas para os linfonodos (*homing*). A exposição à alta glicose não influenciou a expressão dos marcadores de diferenciação/maturação. Esses resultados são contrários aos relatados em estudo com células dendríticas primárias⁶⁵, que demonstra aumento na

expressão dos marcadores CD83 e CD86. A diferença no tipo celular utilizado (linhagem DC2.4 X células dendríticas primárias) possivelmente justifica a discrepância de resultados, uma vez que a linhagem DC2.4 já apresenta um estado de pré-ativação ou “ativação parcial”, como indica o efeito discreto (embora significativo) do estímulo com LPS por 18 h.

De forma complementar e também como alternativa à avaliação dos marcadores clássicos de ativação/maturação, verificamos a influência da elevada concentração de glicose na expressão gênica de citocinas inflamatórias pelas DCs. Os resultados indicam um marcante aumento da expressão gênica constitutiva (i.e., não estimulada) de IL-6 e TNF- α nas células expostas à alta concentração de glicose.

A maior parte dos trabalhos^{2, 30, 50, 83} relata o aumento da produção de citocinas inflamatórias por células coletadas de pacientes portadores de diabetes tipo 2. No entanto, a comparação dos nossos resultados com a literatura deve ser feita com cautela, uma vez que no diabetes in vivo existem outros fatores atuantes na regulação da biologia celular, em especial os produtos de glicação avançada (AGEs) e a peroxidação lipídica (decorrentes do aumento do estresse oxidativo), que representam importantes mecanismos associados às complicações diabéticas relacionadas à regulação da resposta imune. Especulativamente, consideramos que o aumento da expressão gênica de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) observado estaria relacionado primariamente ao estresse oxidativo causado pela exposição à alta glicose, que teria um papel-chave na ativação de vias de sinalização intracelular envolvidas na indução da expressão gênica inflamatória³⁰. Por outro lado, a exposição à elevada concentração de glicose também aumentou marcadamente a expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL-10. Especulamos que o aumento da expressão de IL-10 estaria relacionado à indução de função tolerogênica nas células dendríticas pela alta glicose⁴⁶, que pode estar implicada na menor resistência à infecção. É preciso considerar as limitações relacionadas à análise restrita à avaliação da expressão gênica (RNAm), uma vez que mecanismos pós-transcricionais podem influenciar notadamente a produção e secreção das proteínas. No entanto, não podemos afastar a possibilidade que a expressão gênica observada após 18 h de estímulo com LPS seja influenciada por proteínas secretadas pelas células neste período, em se tratando de genes de resposta rápida/precoce como TNF e IL-12 (não avaliado).

É interessante destacar que a regulação da expressão de IL-10 por LPS foi a única não afetada pela exposição à alta concentração de glicose em comparação às

células expostas à concentração normal de glicose. O estímulo com LPS de células expostas à alta concentração de glicose deixou de induzir a expressão de TNF e resultou em efeito oposto na expressão de IL-6. No caso da expressão de TNF, é possível que a alta concentração de glicose já represente um estímulo tão potente que tornou as células irresponsivas ao estímulo adicional com LPS, em contraste à indução observada em células expostas a concentrações normais de glicose. Em relação à expressão de IL-6, especulamos que a modulação de vias de sinalização específicas (por ex., STAT3) pode estar associada à redução da expressão de IL-6 observada na presença de alta concentração de glicose em comparação à concentração de glicose normal.

A elevada concentração de glicose inibiu a quimiotaxia das células dendríticas. Este achado não deve estar relacionado à modulação da expressão de CCR7 ou ao estado de maturação das DCs, uma vez que nossos resultados indicaram que não houve efeito significativo da alta concentração de glicose na maturação de células dendríticas. No entanto, na presença do estímulo quimiotático com CCL-19, as células expostas à alta concentração de glicose tiveram aumento significativo da quimiotaxia, o que não foi observado nas células cultivadas em concentrações normais de glicose, que se mostraram irresponsivas à CCL-19. De qualquer forma, mesmo na presença de CCL-19, a quimiotaxia de DCs expostas à elevada concentração de glicose foi inferior à de DCs expostas à concentração normal de glicose. Esses resultados podem ser característicos da linhagem celular DC2.4 e de seu estado basal de ativação/maturação. É possível que o aumento da quimiotaxia induzido por CCL-19 verificado apenas quando as células DC2.4 foram expostas à elevada concentração de glicose pode ser mediado por aumento no metabolismo energético celular. Como complementação deste experimento, verificando o efeito da exposição a concentrações normais e elevadas de glicose acrescentando a influência do microambiente associado ao diabetes in vivo (com o acúmulo de AGEs, ROS e mediadores inflamatórios), avaliamos o “homing” das DCs para os linfonodos in vivo. Notadamente, a condição de diabetes in vivo foi associada à marcante redução da migração de DCs aos linfonodos. Este efeito deve ser, ao menos em parte, influenciado pela exposição à elevada concentração de glicose, uma vez que em animais não-diabéticos a migração de DC2.4 expostas à elevada concentração de glicose foi significativamente inibida em comparação às DC2.4 expostas à concentrações normais de glicose.

Coletivamente, os resultados deste estudo indicam que a exposição à elevada concentração de glicose afeta a biologia de células dendríticas. Esta influência é

complexa e por um lado tem um efeito supressor da função de ativação da resposta imune (redução da proliferação e sobrevivência das DCs, inibição da fagocitose e quimiotaxia / homing); por outro lado está relacionada à inflamação (aumento da expressão de TNF e da produção de ROS). Estes efeitos da elevada concentração de glicose encontram paralelo nos aspectos de menor resistência à infecção e maior severidade de inflamação crônica associados à condição de diabetes in vivo.

7 CONCLUSÃO

Em resposta à hipótese deste trabalho, concluímos que a exposição à elevada concentração de glicose afeta a biologia de células dendríticas.

REFERÊNCIAS*

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2014; 37 Suppl 1: 14-80.
2. Arnalich F, Hernanz A, Lopez-Maderuelo D, Pena JM, Camacho J, Madero R, et al. Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type II diabetes. *Horm Metab Res*. 2000; 32(10): 407-12.
3. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 767-811.
4. Berbaum K, Shanmugam K, Stuchbury G, Wiede F, Korner H, Munch G. Induction of novel cytokines and chemokines by advanced glycation endproducts determined with a cytometric bead array. *Cytokine*. 2008; 41(3): 198-203.
5. Bierhaus A, Stern DM, Nawroth PP. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr Opin Investig Drugs*. 2006; 7(11): 985-91.
6. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res*. 2002; 512(2-3): 121-34.
7. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865): 813-20.
8. Buttari B, Profumo E, Capozzi A, Facchiano F, Saso L, Sorice M, et al. Advanced glycation end products of human beta (2) glycoprotein I modulate the maturation and function of DCs. *Blood*. 2011; 117(23): 6152-61.
9. Campana L, Bosurgi L, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 for stromal cell-derived factor-1/CXCL12-dependent migration of macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2009; 86(3): 609-15.
10. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res*. 2003; 92(7): 785-92.
11. Carrion J, Scisci E, Miles B, Sabino GJ, Zeituni AE, Gu Y, et al. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. *J Immunol*. 2012; 189(6): 3178-87.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

12. Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC, Trimble ER. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int.* 2002; 61(2): 599-608.
13. Chavarry NG, Vettore MV, Sansone C, Sheiham A. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. *Oral Health Prev Dent.* 2009; 7(2): 107-27.
14. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus - present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 8(4): 228-36.
15. Cheng SH, Lo LW. Inorganic nanoparticles for enhanced photodynamic cancer therapy. *Curr Drug Discov Technol.* 2011; 8(3): 250-68.
16. Collison KS, Parhar RS, Saleh SS, Meyer BF, Kwaasi AA, Hammami MM, et al. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J Leukoc Biol.* 2002; 71(3): 433-44.
17. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.* 2004; 5(12): 1219-26.
18. Creusot RJ, Giannoukakis N, Trucco M, Clare-Salzler MJ, Fathman CG. It's time to bring dendritic cell therapy to type 1 diabetes. *Diabetes.* 2014; 63(1): 20-30.
19. Cruvinel WdM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWSd, Silva NPd, et al. Sistema imunitário: parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50: 434-47.
20. Cutler CW, Teng YT. Oral mucosal dendritic cells and periodontitis: many sides of the same coin with new twists. *Periodontol 2000.* 2007; 45: 35-50.
21. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet.* 2011; 378(9785): 31-40.
22. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991; 14(3): 173-94.

23. del Nogal M, Troyano N, Calleros L, Griera M, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D, et al. Hyperosmolarity induced by high glucose promotes senescence in human glomerular mesangial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 54: 98-110.
24. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med.* 1997; 14(1): 29-34.
25. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther.* 2008; 88(11): 1254-64.
26. Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, et al. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature.* 2003; 424(6946): 324-8.
27. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(2): 98-107.
28. Dong K, Ni H, Wu M, Tang Z, Halim M, Shi D. ROS-mediated glucose metabolic reprogram induces insulin resistance in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 476(4): 204-11.
29. Dumitriu IE, Baruah P, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2005; 35(7): 2184-90.
30. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002; 106(16): 2067-72.
31. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002; 23(5): 599-622.
32. Feng M, Li J, Wang J, Ma C, Jiao Y, Wang Y, et al. High glucose increases LPS-induced DC apoptosis through modulation of ERK1/2, AKT and Bax/Bcl-2. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14: 98.
33. Ferlazzo G, Morandi B, D'Agostino A, Meazza R, Melioli G, Moretta A, et al. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003; 33(2): 306-13.

34. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*. 2002; 195(3): 343-51.
35. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*. 1999; 5(4): 405-11.
36. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 245-73.
37. Forbes JM, Yee LT, Thallas V, Lassila M, Candido R, Jandeleit-Dahm KA, et al. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes*. 2004; 53(7): 1813-23.
38. Frasnelli SC, de Medeiros MC, Bastos Ade S, Costa DL, Orrico SR, Rossa Junior C. Modulation of immune response by RAGE and TLR4 signalling in PBMCs of diabetic and non-diabetic patients. *Scand J Immunol*. 2015; 81(1): 66-71.
39. Fukuhara-Takaki K, Sakai M, Sakamoto Y, Takeya M, Horiuchi S. Expression of class A scavenger receptor is enhanced by high glucose in vitro and under diabetic conditions in vivo: one mechanism for an increased rate of atherosclerosis in diabetes. *J Biol Chem*. 2005; 280(5): 3355-64.
40. Gangoiti MV, Cortizo AM, Arnol V, Felice JI, McCarthy AD. Opposing effects of bisphosphonates and advanced glycation end-products on osteoblastic cells. *Eur J Pharmacol*. 2008; 600(1-3): 140-7.
41. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(8): 566-77.
42. Gastaldello K, Husson C, Dondeyne JP, Vanherweghem JL, Tielemans C. Cytotoxicity of mononuclear cells as induced by peritoneal dialysis fluids: insight into mechanisms that regulate osmotic stress-related apoptosis. *Perit Dial Int*. 2008; 28(6): 655-66.
43. Gautam S, Banerjee M. The macrophage Ox-LDL receptor, CD36 and its association with type II diabetes mellitus. *Mol Genet Metab*. 2011; 102(4): 389-98.

44. Ge J, Jia Q, Liang C, Luo Y, Huang D, Sun A, et al. Advanced glycosylation end products might promote atherosclerosis through inducing the immune maturation of dendritic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(10): 2157-63.
45. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(8): 594-606.
46. Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol.* 2014; 5: 7.
47. Granucci F, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell biology. *Adv Immunol.* 2005; 88: 193-233.
48. Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Guilliams M, de Bovis B, et al. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med.* 2010; 207(1): 189-206.
49. Hu Z, Guo X, Yu Q, Qiu L, Li J, Ying K, et al. Down-regulation of adenine nucleotide translocase 3 and its role in camptothecin-induced apoptosis in human hepatoma QGY7703 cells. *FEBS Lett.* 2009; 583(2): 383-8.
50. Kado S, Nagase T, Nagata N. Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 1999; 36(1-2): 67-72.
51. Kanaya S, Nemoto E, Ogawa T, Shimauchi H. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce unique dendritic cell subsets via Toll-like receptor 2. *J Periodontal Res.* 2009; 44(4): 543-9.
52. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(1): 40-4.
53. Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications.* 2006; 20(1): 59-68.

54. King GL, Shiba T, Oliver J, Inoguchi T, Bursell SE. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annu Rev Med.* 1994; 45: 179-88.
55. Kushwah R, Hu J. Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity. *J Immunol.* 2010; 185(2): 795-802.
56. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008; 51(2): 216-26.
57. Leppin K, Behrendt AK, Reichard M, Stachs O, Guthoff RF, Baltrusch S, et al. Diabetes mellitus leads to accumulation of dendritic cells and nerve fiber damage of the subbasal nerve plexus in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(6): 3603-15.
58. Li DS, Warnock GL, Tu HJ, Ao Z, He Z, Lu H, et al. Do immunotherapy and beta cell replacement play a synergistic role in the treatment of type 1 diabetes? *Life Sci.* 2009; 85(15-16): 549-56.
59. Li J, Hou F, Guo Z, Shan Y, Zhang X, Liu Z. Advanced glycation end products upregulate C-reactive protein synthesis by human hepatocytes through stimulation of monocyte IL-6 and IL-1 beta production. *Scand J Immunol.* 2007; 66(5): 555-62.
60. Li L, Sawamura T, Renier G. Glucose enhances human macrophage LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced macrophage foam cell formation. *Circ Res.* 2004; 94(7): 892-901.
61. Li X, Yang A, Huang H, Zhang X, Town J, Davis B, et al. Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42(2): 190-9.
62. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 2002; 82(1): 97-130.
63. Liu Y, Liang C, Liu X, Liao B, Pan X, Ren Y, et al. AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways. *Atherosclerosis.* 2010; 208(1): 34-42.
64. Lo J, Clare-Salzler MJ. Dendritic cell subsets and type I diabetes: focus upon DC-based therapy. *Autoimmun Rev.* 2006; 5(6): 419-23.
65. Lu H, Yao K, Huang D, Sun A, Zou Y, Qian J, et al. High glucose induces upregulation of scavenger receptors and promotes maturation of dendritic cells. *Cardiovasc Diabetol.* 2013; 12: 80.

66. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002; 100(13): 4512-20.
67. Madonna R, Gorbe A, Ferdinandy P, De Caterina R. Glucose metabolism, hyperosmotic stress, and reprogramming of somatic cells. *Mol Biotechnol*. 2013; 55(2): 169-78.
68. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood*. 2009; 113(15): 3418-27.
69. Miyata T, Iida Y, Ueda Y, Shinzato T, Seo H, Monnier VM, et al. Monocyte/macrophage response to beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products. *Kidney Int*. 1996; 49(2): 538-50.
70. Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto M, Inghilleri S, Luisetti M. The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? *Mod Pathol*. 2006; 19(11): 1437-45.
71. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(12): 957-64.
72. Morris EJ, Geller HM. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol*. 1996; 134(3): 757-70.
73. Nah SS, Choi IY, Lee CK, Oh JS, Kim YG, Moon HB, et al. Effects of advanced glycation end products on the expression of COX-2, PGE2 and NO in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47(4): 425-31.
74. Nah SS, Choi IY, Yoo B, Kim YG, Moon HB, Lee CK. Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS Lett*. 2007; 581(9): 1928-32.
75. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*. 1992; 267(21): 14998-5004.
76. Neller MA, Santner-Nanan B, Brennan RM, Hsu P, Joung S, Nanan R, et al. Multivariate analysis using high definition flow cytometry reveals distinct T cell repertoires between the fetal-maternal interface and the peripheral blood. *Front Immunol*. 2014; 5: 33.

77. Nishizawa T, Bornfeldt KE. Diabetic vascular disease and the potential role of macrophage glucose metabolism. *Ann Med*. 2012; 44(6): 555-63.
78. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest*. 2001; 108(12): 1853-63.
79. Palucka K, Banchereau J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14(4): 420-31.
80. Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007; 23(1): 3-13.
81. Pertynska-Marczewska M, Kiriakidis S, Wait R, Beech J, Feldmann M, Paleolog EM. Advanced glycation end products upregulate angiogenic and pro-inflammatory cytokine production in human monocyte/macrophages. *Cytokine*. 2004; 28(1): 35-47.
82. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med*. 2002; 195(3): 335-41.
83. Pickup JC, Chusney GD, Mattock MB. The innate immune response and type 2 diabetes: evidence that leptin is associated with a stress-related (acute-phase) reaction. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 52(1): 107-12.
84. Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis: oral complication of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013; 42(4): 849-67.
85. Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone*. 2010; 46(4): 1122-30.
86. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol*. 1997; 158(6): 2723-30.

87. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; 116(11): 3015-25.
88. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(3): 151-61.
89. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol*. 2007; 8(3): 285-93.
90. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991; 9: 271-96.
91. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973; 137(5): 1142-62.
92. Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 1999; 66(2): 205-8.
93. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*. 1979; 149(1): 1-16.
94. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med*. 1974; 139(6): 1431-45.
95. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75(10): 5132-6.
96. Stewart Williams J, Ling R, Searles AM, Doran CM, Byles J. Identification of higher hospital costs and more frequent admissions among mid-aged Australian women who self-report diabetes mellitus. *Maturitas*. 2016; 90: 58-63.
97. Suss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1996; 183(4): 1789-96.
98. Trachtman H, Futterweit S, Prenner J, Hanon S. Antioxidants reverse the antiproliferative effect of high glucose and advanced glycosylation end products in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 199(1): 346-52.

99. Wallet MA, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res.* 2005; 3(3): 166-75.
100. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2011; 241(1): 241-59.
101. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(5): 1047-53.
102. Wilensky A, Segev H, Mizraji G, Shaul Y, Capucha T, Shacham M, et al. Dendritic cells and their role in periodontal disease. *Oral Dis.* 2014; 20(2): 119-26.
103. Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem.* 2008; 283(40): 27255-69.
104. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med (Berl).* 2009; 87(3): 235-47.
105. Yaochite JN, Caliari-Oliveira C, de Souza LE, Neto LS, Palma PV, Covas DT, et al. Therapeutic efficacy and biodistribution of allogeneic mesenchymal stem cells delivered by intrasplenic and intrapancreatic routes in streptozotocin-induced diabetic mice. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6: 31.
106. Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, Allgeier S, Winter K, Ziegler I, et al. Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes.* 2014; 63(7): 2454-63.
107. Zitvogel L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med.* 2002; 195(3): F9-14.

UNESP

FACULDADE DE MEDICINA

CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria CFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1091/2014-CEUA

CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1091/2014) **Avaliação do efeito do diabetes melitus tipo 1 na ativação da resposta imune adaptativa mediada por células dendríticas**, a ser conduzido por Sabrina Cruz Talle Frasnelli, orientada pela Prof^a. Dr^a. Camila Renata Correa Camacho, co-orientada por Silvana Regina Perez Orrico, com a colaboração de Carlos Rossa Junior, Igor Otávio Minatel e Klinsmann Carolo dos Santos, com o Apoio Técnico de Carlos Roberto Gonçalves Lima, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "camundongos" são provenientes de Biotério Convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

CERTIFICAMOS, ainda que foi autorizada a utilização de "30 camundongos". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.

Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 31/07/2014

Kleber Messias da Camargo
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3960-1608/3990-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 21 de Julho de 2018

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 21 de julho de 2016

SABRINA CRUZ TFAILE FRASNELLI DE SOUZA