



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Frederico Ribeiro Campos Costa

A ativação do receptor NOD2 contribui para a imunopatogenia do
diabetes tipo 1 experimental

Ribeirão Preto

2014

Frederico Ribeiro Campos Costa

A ativação do receptor NOD2 contribui para a imunopatogenia do diabetes tipo 1
experimental

Dissertação de mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto – USP para obtenção do título
de mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia
Básica e Aplicada

Orientador: Dr^a. Daniela Carlos
Sartori

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Costa, Frederico Ribeiro Campos

A ativação do receptor NOD2 contribui para a imunopatogenia do diabetes tipo 1 experimental. Ribeirão Preto, 2014.

87 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Sartori, Daniela Carlos.

1. Balanço Treg/Th17/Th1. 2. Macrófagos M1 e M2. Microbiota. 4.NOD2. 5.Diabetes tipo 1.

Nome: **Frederico Ribeiro Campos Costa**

Título: A ativação do receptor NOD2 contribui para a imunopatogenia do diabetes tipo 1 experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof (a). Dr (a).: **Daniela Carlos Sartori** Instituição: **FMRP - USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Dario Simões Zamboni** Instituição: **FMRP-USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: **Niels Olsen Câmara** Instituição: **ICB-USP**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP, com apoio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPESP.

*“Não te preocupes se as pessoas não reconhecem
teus méritos; preocupa-te se não reconheceres os delas”*

Confúcio

*“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas
as mentes preparadas”*

Louis Pasteur

**Dedico este trabalho aos meus pais, Arlete e Epaminondas, e à minha irmã Raquel. Amo
você.**

Agradecimientos

Ao prof. Dr. João Santana da Silva, exemplo maior de amor e dedicação à ciência, obrigado por me acolher no laboratório e pelos conhecimentos transmitidos. Serei eternamente grato ao senhor pela oportunidade.

À minha orientadora, Dra. Daniela Carlos, muito obrigado pelos ensinamentos, paciência e confiança no meu trabalho. Que venham os próximos 4 anos!

Aos colegas/amigos de laboratório: Tiagão, Marcelinha, Davoli, Murilo, Rodrigo, Laixxx, Manu, Nat, Ricardo, Gustavo, Maria do Carmo, Cráudia, Bruna, Vanessa, Lu, Denise, Renata, Fer, Carla, Diegão, Djalma, Amandão, Biffi, Bradock, Gustavão, muito obrigado pela companhia nesses dois longos anos de jornada! Sem vocês, não teria aguentado pipetar pelas madrugadas afora!

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse projeto, em especial: Xuxa, Júlio, Rubilan, vulgo “Rubs”, Denise Ferraz, Vânia e Wander, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Marcelinha, por toda a ajuda e discussões (não só científicas) ao longo desses dois anos. Muito obrigado!

A todos os meus amigos de Uberlândia, que conseguem como ninguém me fazer esquecer dos problemas da “vida científica” quando os encontro. Em especial: Leandro Pedreiro, Gustavo (Bambu), Black, “Dr.” Garça e Zezé. Amo todos vocês, meus amigos!

Às agências financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPESP.

1. Resumo

Diabetes tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune que se inicia devido a defeitos na tolerância imunológica a auto-antígenos, resultando na destruição autoimune das células β pancreáticas em indivíduos geneticamente suscetíveis. Os receptores NOD-like (NLRs) são receptores intracelulares responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Estudos recentes têm demonstrado que os receptores NOD1 e NOD2 desempenham um importante papel na ativação da imunidade inata contra patógenos e na regulação da imunidade adaptativa, uma vez que sua ativação leva à produção de citocinas relacionadas à diferenciação de linfócitos T auxiliares produtores de IL-17 (Th17). Porém, a importância desses receptores no DM1 ainda é incerto. Nesse sentido, investigamos o papel dos receptores NOD1 e NOD2 na patogênese do DM1, com enfoque na diferenciação de linfócitos Treg/Th17/Th1 e na plasticidade desses subtipos celulares. Nossos resultados mostram que camundongos deficientes de NOD2, mas não NOD1 ou RIP2, são resistentes ao DM1, como comprovado por menor incidência, hiperglicemia, diminuição do infiltrado inflamatório e normalização dos níveis de insulina quando comparado aos controles. Foi observado também que animais NOD2^{-/-} tiveram uma redução da população de linfócitos Th17, Tc17, Th1 e T citotóxicos nos linfonodos pancreáticos, o que correlaciona com a inibição da produção de IL-23p19 e IFN- γ no pâncreas. Em paralelo, foi evidenciado o aumento do número de células T reguladoras, macrófagos do perfil M2 nos linfonodos pancreáticos e elevada produção de IL-10 no pâncreas de animais NOD2^{-/-}. Além disso, foi observado que animais NOD2^{-/-} apresentaram uma menor população de linfócitos T duplo-positivos (Foxp3⁺ROR γ t⁺ e IL-17⁺IFN γ ⁺). Posteriormente, foi detectado menor produção de IL-1 β , IL-6, IL-23p19 e IL-12p40 por células dendríticas de animais deficientes de NOD2. De forma interessante, foi observada a translocação de bactérias para os linfonodos pancreáticos de animais diabéticos. Adicionalmente, animais tratados com antibióticos tornaram-se resistentes ao DM1, o que nos fornece indícios da contribuição da microbiota intestinal na indução da doença. Por fim, comprovamos alta expressão gênica de NOD2 nos linfonodos pancreáticos e no pâncreas na fase inicial (pré-diabética) em outro modelo de DM1, utilizando camundongos NOD (*nonobese diabetic mice*). Portanto, nossos dados indicam que a ativação do receptor NOD2 por componentes bacterianos da microbiota intestinal induz a produção de citocinas pró-inflamatórias com subsequente diferenciação/conversão de linfócitos do perfil Th17/Th1 e progressão do DM1. Dessa forma, estes dados apontam o bloqueio do receptor NOD2 como uma potencial terapia imunomoduladora para o DM1 em humanos.

Palavras – chave: Balanço Treg/Th17/Th1; Macrófagos M1 e M2; Microbiota; NOD2; Diabetes tipo 1

1. Abstract

Type 1 diabetes is an autoimmune disease that precipitates due to defects in the self tolerance to auto-antigens, resulting in the autoimmune destruction of the pancreatic β cells in genetically susceptible individuals. NOD-like (NLRs) receptors are intracellular receptors responsible for the recognition of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and damage associated molecular patterns (DAMPs). Recent studies have shown a role of NOD1 and NOD2 receptors in the innate immune response against pathogens and in the adaptive immune response, since its activation leads to the generation of cytokines related to the differentiation of IL-17-producing T helper cells (Th17). However, the role of these receptors in T1D remains elusive. Therefore, we investigated the role of NOD1 and NOD2 receptors in the pathogenesis of T1D, focusing on the differentiation of Treg/Th1/Th17 lymphocytes and in the plasticity of these subtypes. Our data demonstrate that NOD2^{-/-} mice, but not NOD1^{-/-} or RIP2^{-/-}, are resistant to T1D, as shown by the lower incidence, hyperglycemia, less insulinitis and normal insulin production when compared to *wild type* mice. It was also observed that NOD2^{-/-} mice have a reduction in the Th17, Tc17, Th1 and cytotoxic T lymphocyte population within the pancreatic lymph nodes (PLNs), which correlates with the inhibition of IL-23p19 and IFN γ production in the pancreas. In parallel, there was an increase in Treg cells, M2 macrophages in the PLNs and IL-10 production in the pancreatic tissue of NOD2^{-/-} mice. Also, NOD2^{-/-} mice presented a downregulation of Foxp3⁺ROR γ t⁺ and IL-17⁺IFN γ ⁺ double-positive T cells. Later, it was shown that IL-1 β , IL-6, IL-23p19 and IL-12p40 production was downregulated in mice deficient to the NOD2 receptor. Interestingly, we observed a bacterial translocation to the pancreatic lymph nodes in diabetic mice, what could be triggering NOD2 activation, thus contributing to T1D development. As expected, mice pre-treated with antibiotics failed to become diabetic, suggesting a possible role of the gut microbiota in the development of the disease. Lastly, we observed a higher relative expression of NOD2 in the PLNs and pancreas of pre-diabetic mice, using another mouse model of the disease, the *nonobese diabetic* (NOD) mouse. Collectively, our data suggest that components from the gut microbiota are capable of translocating to the PLNs, thus triggering the activation of NOD2, which in turn induces the production of proinflammatory cytokines related to the differentiation of Th1/Th17 cells, thus contributing to T1D development in a mouse model of the disease. Therefore, the blockade of NOD2 appears as an interesting therapeutical target in the treatment of type 1 diabetes in humans.

Keywords: Treg/Th1/Th17 balance; M1 and M2 macrophages; Gut Microbiota; NOD2; Type 1 Diabetes

SUMÁRIO

	Página
1 Introdução e Justificativa	13
2 Objetivos	30
2.1 Objetivo Principal	31
2.2 Objetivo Específico	31
3 Metodologia Experimental	32
3.1 Animais	33
3.2 Indução de DM1 por STZ	33
3.3 Monitoramento da glicemia	33
3.4 Reação de Imunoistoquímica	33
3.5 Análise histopatológica	34
3.6 Avaliação e separação (<i>sorting</i>) de leucócitos por citometria de fluxo (FACS)	34
3.7 Extração de RNA	35
3.8 Reações de PCR em tempo real	35
3.9 Quantificação de citocinas por ELISA	36
3.10 Cultura de macrófagos da medula óssea (BMM ϕ s)	36
3.11 Cultura de células dendríticas da medula óssea (BM-DCs)	36
3.12 Pré-tratamento com antibióticos e ensaio de translocação bacteriana	37
3.13 Análise estatística	37
4 Resultados	39
4.1 Deficiência do receptor NOD2 confere resistência ao desenvolvimento do DM1 experimental	40
4.2 Deficiência do receptor NOD2 inibe o processo inflamatório (insulite) e a destruição de células β nas ilhotas pancreáticas	44
4.3 Alteração da população de linfócitos T expressando ROR γ t (Th17/Tc17)	

e Foxp3 (Treg) nos LNP e baço de camundongos deficientes de NOD2	48
4.4 Alteração da população de linfócitos T expressando IFN- γ (Th1 e T citotóxicos) nos LNP e baço de camundongos deficientes de NOD2	50
4.5 Diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento de IL-10 no tecido pancreático de camundongos deficientes de NOD2	53
4.6 Inibição da população de linfócitos T duplo-positivos IL-17 ⁺ IFN γ ⁺ e Foxp3 ⁺ ROR γ t ⁺ nos LNP de camundongos deficientes de NOD2	55
4.7 Transferência de linfócitos Tc17 não reverteu a resistência de camundongos deficientes de NOD2 ao DM1	57
4.8 Aumento da população de células mielóides nos LNP de camundongos deficientes do receptor NOD2	59
4.9 Reduzida expressão das citocinas IL-23 e IL-6 por células dendríticas derivadas de camundongos deficientes do receptor NOD2	61
4.10 Aumento de macrófagos do perfil M2 em detrimento de M1 nos LNP de camundongos deficientes do receptor NOD2	63
4.11 Efeito do MDP <i>in vitro</i> na polarização de macrófagos M1 e na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias	65
4.12 Contribuição da microbiota intestinal na suscetibilidade ao DM1 induzido por STZ	67
4.13 Correlação da expressão gênica do receptor NOD2 e moléculas/receptores de linfócitos Treg/Th17 no modelo de DM1 determinado geneticamente	69
Discussão	72
Referências	79

1. Introdução e Justificativa

1.1 Diabetes do tipo 1: Aspectos gerais

O Diabetes tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune que se manifesta em indivíduos geneticamente suscetíveis, mas também é fortemente influenciada pela ação de fatores ambientais (ATKINSON; EISENBARTH, 2001). O DM1 é caracterizado pela disfunção do pâncreas decorrente da destruição seletiva das células β presentes nas ilhotas pancreáticas e produtoras de insulina por linfócitos T autorreativos. Esse processo destrutivo leva à falta do hormônio insulina, que resulta em um estado de hiperglicemia devido ao aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captura de glicose na circulação. (BELLE; COPPIETERS; HERRATH, 2011). Atualmente, vários genes de suscetibilidade ao DM1 foram identificados, dando origem ao termo *loci* de suscetibilidade ao diabetes mellitus dependente de insulina, ou simplesmente, IDDM. Dentre esses *loci*, podemos destacar por exemplo, o IDDM1, que corresponde aos genes do complexo de histocompatibilidade em humanos (HLA), localizados no cromossomo 6p21 (NERUP *et al.*, 1974); IDDM2, que corresponde ao *locus* que codifica o gene da insulina no cromossomo 11 (JULIER *et al.*, 1991); o *locus* IDDM12, que codifica a molécula CTLA-4 (NISTICÒ *et al.*, 1996); dentre outros.

As evidências de que fatores ambientais estariam envolvidos no desencadeamento da doença provém de estudos utilizando taxas de concordância na incidência da doença, que é de 50% entre gêmeos monozigóticos, e de apenas 10% entre gêmeos dizigóticos (KYVIK; GREEN; BECK-NIELSEN, 1995). Segundo o estudo multicêntrico EURODIAB (PATTERSON *et al.*, 2009), foi observado um acelerado aumento da incidência da doença nos últimos anos, que não poderia ser explicado apenas pelo aumento da transmissão de haplótipos de suscetibilidade de uma geração para outra (GILLESPIE *et al.*, 2004), dando indícios de que fatores ambientais também poderiam ser importantes no desencadeamento da doença. Sendo assim, diversos fatores ambientais foram propostos até o momento, como sendo responsáveis pelo “*gatilho*” da doença, como por exemplo, infecções virais (FILIPPI; VON HERRATH, 2008), disbiose da microbiota intestinal (VAARALA; ATKINSON; NEU, 2008), e até mesmo produtos da dieta, como leite de vaca (KOSTRABA *et al.*, 1993), glúten (BEALES *et al.*, 2002) e vitamina D (BAILEY *et al.*, 2007).

O DM1 é dividido entre a fase pré-clínica, caracterizado pela presença de insulite devido à infiltração de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas, seguido pela fase clínica que se inicia somente após a destruição de 80-90% das células β . Uma série de eventos precede o diagnóstico clínico da doença e está representado na Figura 1 (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). Inicialmente, a suscetibilidade genética (A1) juntamente a um fator ambiental (A2) leva ao início da doença através de dois eventos principais. No pâncreas, as células aumentam a produção de *interferon alfa* (IFN- α) (B3) e posteriormente a expressão de MHC de classe I (C3). Tal evento expõe as células β ao ataque de linfócitos T CD8⁺ autorreativos com especificidade para auto-antígenos do pâncreas (C3). Conseqüentemente, os auto-antígenos liberados pelas células β são internalizados por células apresentadoras de antígenos (APCs) residentes (C3) e transportadas para o linfonodo pancreático drenante (C2). Ao mesmo tempo, na periferia (C1), o fator ambiental acarreta em uma mudança no perfil metabólico desses indivíduos, levando, por exemplo, a uma redução no soro de metabólitos como succinato, fosfatidilcolina, fosfolípidos e aumento de ácido glutâmico (KUPILA *et al.*, 2001). Estas alterações metabólicas criam um ambiente pró-inflamatório (KABAROWSKI *et al.*, 2001) que favorece a resposta de linfócitos T efetoras (Teff), em detrimento de linfócitos T reguladores (Treg). Os auto-antígenos das células β reconhecidos neste contexto pró-inflamatório, juntamente com o auxílio de células T CD4⁺ (C2) iniciam a conversão de linfócitos B em plasmócitos (D2), dando início a produção de auto-anticorpos (soroconversão) (D1). Além disso, linfócitos T CD8⁺ autorreativos são estimulados a proliferarem (D2) e migrarem para o pâncreas (D3). O dano tecidual induzido pela morte de células β (D3), decorrente da ação de grânulos citotóxicos, tais como perforina e granzima, assim como a ação de citocinas pró-inflamatórias como IFN γ e TNF α , induz um comprometimento da produção de insulina (pseudo-atrofia). Em adição, a morte dessas células β também leva a liberação de novos auto-antígenos que são internalizados por APCs, incluindo linfócitos B que migraram para o local (D2). Tal fato leva a uma nova especificidade de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (E2) e linfócitos B (E1), em um processo conhecido como espalhamento de epítipo, levando a uma depleção mais severa das células β , tanto na massa como na função (E3). Concomitantemente, a resposta auto-imune gerada pode estimular a proliferação de células β (F3). Além disso, linfócitos T reguladores podem, em alguns casos, se sobrepor e controlar a resposta imune

efetora (F3). Portanto, o balanço entre resposta autorreativa destrutiva e resposta reguladora, promove um estado transiente de produção suficiente de insulina pelo indivíduo, mesmo após o início clínico da doença. Este período é conhecido como “fase de lua de mel” (F3). Eventualmente, a resposta autoimune prevalece, o que leva a destruição quase que completa das células β produtoras de insulina, sendo que cerca de apenas 10-30% dessas células continuam funcionais após este período. Apesar de não ter sido citado na figura, um importante papel de células (NK) (*natural killer*) também tem sido atribuído no desencadeamento do DM1 (LEHUEN *et al.*, 2010). O estudo utilizando modelos experimentais em camundongos tem sido fundamental na elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença, sendo os modelos NOD (*nonobese diabetic mice*) e induzido quimicamente por STZ (estreptozotocina) os mais utilizados.

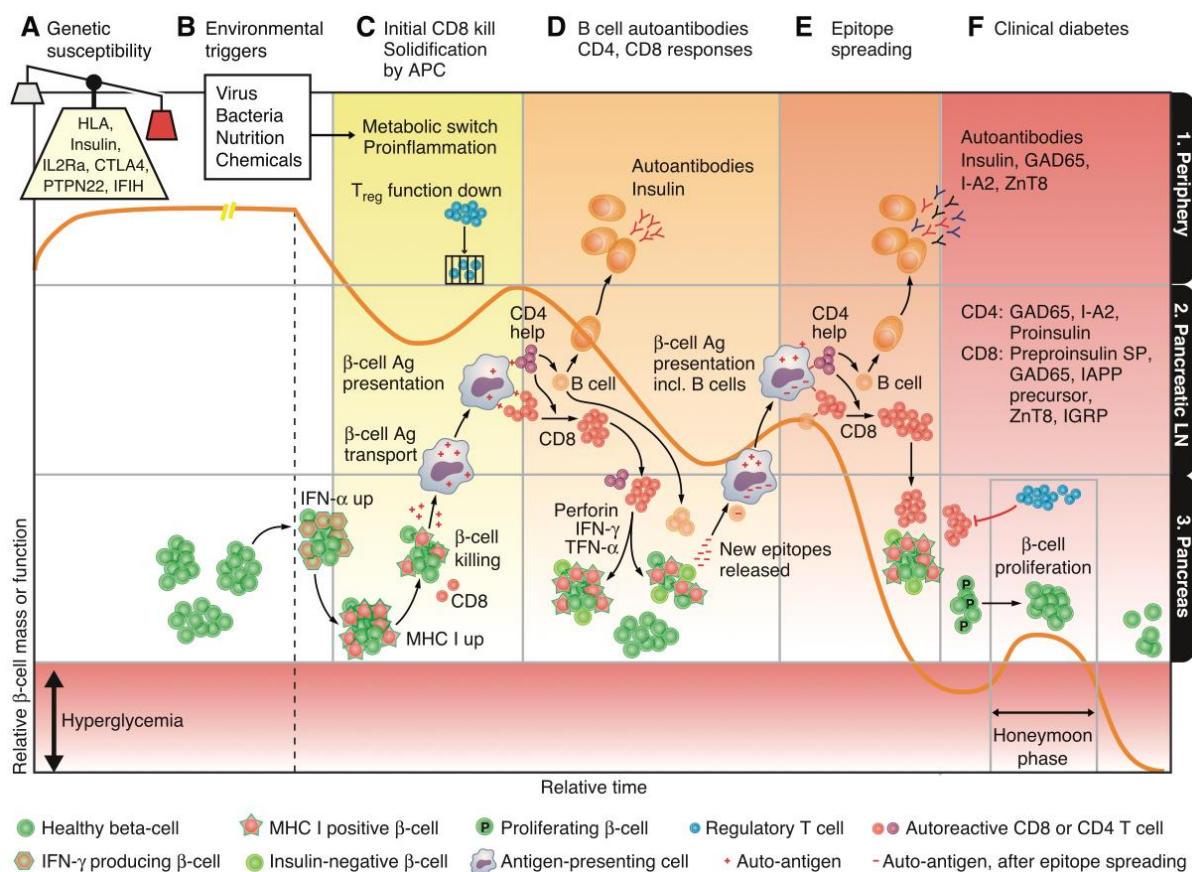


Figura 1: Possíveis eventos desencadeadores da doença (BELLE; COPPIETERS; HERRATH, 2011)

1.2 Modelo experimental NOD e induzido por STZ

Camundongos diabéticos não obesos (*Nonobese diabetic NOD*) desenvolvem espontaneamente diabetes como consequência de processos autoimunes e compartilham várias características patológicas com a doença humana (ANDERSON; BLUESTONE, 2005). Foi postulado que o desenvolvimento da diabetes nestes animais requer a presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, uma vez que clones de linfócitos T provenientes de camundongos NOD respondem aos auto-antígenos das células β pancreáticas. Em adição, foi demonstrado que camundongos NOD sem timo ou NOD/SCID (*severe combined immunodeficiency*) não desenvolvem insulite ou diabetes (CHRISTIANSON *et al.*, 1993). Apesar de linfócitos CD4⁺ do padrão Th1 e linfócitos CD8⁺ desempenharem papel proeminente na patogênese do DM1, achados recentes sugerem que linfócitos Th17 parecem representar importante marcador da progressão da insulite e magnitude da diabetes devido à precoce detecção da citocina IL-17 no sangue periférico destes animais (VUKKADAPU *et al.*, 2005).

A administração de estreptozotocina (STZ) em linhagens de camundongos suscetíveis como a C57BL/6 pode induzir um quadro de DM1 que se assemelha em vários aspectos ao modelo geneticamente determinado (NOD) e humana (CASTANO; EISENBARTH, 1990). A STZ é um análogo da N-acetilglucosamina isolada do microorganismo *Streptomyces achromogenes*. Este composto químico é muito similar a molécula de glicose, e pode ser transportado para o interior das células via proteína transportadora de glicose 2 (GLUT2), mas ela não é reconhecida pelos demais transportadores de glicose. Isso explica a toxicidade sítio-específica em células β , uma vez que esse tipo celular apresenta altos níveis de expressão do receptor GLUT2. A dose e a frequência de STZ neste modelo experimental é relevante, uma vez que elevadas doses são extremamente tóxicas, por ser um agente alquilante, induzindo diabetes fulminante (WOOD; RAO; FREY, 1999). No regime de múltiplas doses, a toxicidade aguda das células β não é observada, mas a tolerância aos antígenos das ilhotas é abolida resultando no desenvolvimento de uma resposta humoral com produção de anticorpos (HEROLD *et al.*, 1995) quanto uma resposta celular mediada por linfócitos T auto-reativos específicos para antígenos das células β (HORWITZ *et al.*, 2002). Neste contexto, um importante papel de células

T reguladoras (CD4⁺Foxp3⁺) tem sido atribuído no controle de processos autoimunes e patológicos, incluindo o diabetes tipo 1 (PICCIRILLO et al., 2005).

1.3 Linfócitos T reguladores (Treg): geração, caracterização e função

Diferentes subgrupos de linfócitos Treg têm sido descritos, sendo que a heterogeneidade decorre de diferenças no desenvolvimento, diferenciação, migração e propriedades imunossupressoras (HUEHN et al., 2004; KOENEN; FASSE; JOOSTEN, 2005; LIM; BROXMEYER; KIM, 2006). Os linfócitos Tregs naturais CD4⁺CD25⁺ surgem no timo através do reconhecimento de auto-antígenos e constituem aproximadamente 2-10% da população de células T CD4⁺, portanto a timectomia resulta em ablação destas células e aparecimento de autoimunidade (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; TUNG et al., 2001). Em adição, a depleção ou comprometimento funcional destas células também potencializa a imunidade contra tumores, alergias, transplantes e a inflamação em resposta à patógenos, demonstrando que estas células representam um elo no controle da resposta imune contra antígenos próprios e não-próprios (SGOUROUDIS; PICCIRILLO, 2009). As células Tregs naturais são caracterizadas pela expressão constitutiva da molécula CD25 (cadeia α do receptor de IL-2, IL-2R α) e apresentam de maneira intrínseca atividade imunossupressora. Já as células T reguladoras induzidas adquirem este fenótipo na periferia após a exposição de mediadores solúveis como as citocinas IL-10 e TGF- β ou na presença de células apresentadoras de antígenos (APCs) pulsadas com produtos microbianos (O'GARRA et al., 2004).

Mutações no gene Foxp3 (forkhead transcription factor 3) foram identificadas como fatores desencadeantes de uma síndrome autoimune fatal denominada IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) observada em pacientes, e em camundongos (denominados *scurfy mice*), sendo o fenótipo revertido pela administração de linfócitos T reguladores (BRUNKOW et al., 2001; FONTENOT; RUDENSKY, 2005). Não obstante, foi verificado que a expressão retroviral do gene Foxp3 em células T de camundongos acarreta a aquisição de um perfil de linfócitos T reguladores, os quais se tornam anérgicos e com atividade supressora, indicando que o gene do Foxp3 que codifica o fator de transcrição Foxp3, determina a origem, manutenção e atividade funcional dessas células (GAVIN et al., 2007; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; JAECKEL;

VON BOEHMER; MANN, 2005). Em adição, as células Tregs CD4⁺CD25⁺ também expressam de maneira constitutiva as moléculas de superfície CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor*) e PD-1 (*programmed death-1*), assim como OX40, CD39, CD73 (BELKAID; TARBELL, 2009; DEAGLIO et al., 2007). A molécula CD27 foi identificada como um marcador estável em células Tregs em tecidos inflamados (RUPRECHT et al., 2005).

Evidências da literatura sugerem que o TGF- β é o fator que promove a transcrição de Foxp3 in vitro em células T CD4⁺ estimuladas, indução de anergia e atividade supressora. Concomitante, foi verificado que na presença de TGF- β , linfócitos T reguladores funcionais podem ser induzidos na periferia, os quais expressam de maneira significativa Foxp3 (VIEIRA et al., 2004). Adicionalmente, a citocina IL-2 também parece ter um papel fundamental na geração e homeostase de células Tregs induzidas. Neste sentido, IL-2 exógena reverte o estado anérgico de linfócitos T reguladores e interfere na sua capacidade em induzir supressão (TAKAHASHI et al., 1998). Em contrapartida, o tratamento com anticorpos anti-CTLA-4 ou GITR, é capaz de abolir a atividade supressora dessas células (READ; MALMSTROM; POWRIE, 2000; SHIMIZU et al., 2002). Todavia, análises de expressão gênica têm revelado elevada expressão do receptor OX40, um membro da superfamília do TNF, em linfócitos T reguladores comparado com linfócitos convencionais CD4⁺CD25⁻ (GAVIN et al., 2002; MCHUGH et al., 2002). Em adição, foi reportado que o receptor OX40 contribui para a indução, manutenção assim como potencializa sua atividade supressora (TAKEDA et al., 2004). À partir destas observações, podemos concluir que diferentes moléculas de superfície e vias de sinalização intracelulares participam na regulação, manutenção do fenótipo e função de linfócitos T reguladores.

1.4 Linfócitos T reguladores no DM1 murino e em humanos

Os linfócitos Tregs desempenham papel fundamental na prevenção de autoimunidade em modelos experimentais, por isso têm sido alvos atrativos para a terapia celular usando essas células em processos autoimunes em humanos (BLUESTONE; TANG, 2004). De fato, muitos estudos confirmaram que Tregs participam do controle do DM1, limitando sua progressão; e que a reduzida frequência destas células pode representar um fator predisponente para o desenvolvimento da doença (LIU et al., 2006). Em adição, foi observado decréscimo da atividade supressora de Tregs isoladas de

PBMC de pacientes com DM1, psoríase, miastenia grave, artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil e lúpus eritematoso sistêmico (BAECHER-ALLAN; HAFLER, 2006; RANDOLPH; FATHMAN, 2006). Portanto, a evidência de uma ampla variedade de DAIs apresentarem defeito na função e/ou frequência de Tregs é particularmente interessante e levanta a questão da existência de um denominador comum na causa das DAIs humanas.

Estudos recentes apontam um papel essencial dos linfócitos Treg na manutenção da auto-tolerância em camundongos NOD (*nonobese diabetic*), uma vez que a depleção de linfócitos expressando CD25 ou bloqueio da via CD28/B7 acelera o desenvolvimento do DM1 (SALOMON et al., 2000; TANG et al., 2003). Uma questão central ainda não totalmente elucidada é se o início do DM1 é devido ao declínio da frequência/função das Tregs ou ativação/expansão descontrolada de células T auto-reativas. Neste sentido, dados descritos na literatura são inconclusivos em determinar se a resistência progressiva de células T auto-reativas à supressão das Treg decorre da função defeituosa destas células ou reduzida frequência ao longo do tempo (BRUSKO et al., 2007; MELLANBY et al., 2007). Em linhas gerais, apesar de um estudo demonstrar que o defeito quantitativo contribui para a progressão do DM1 (POP et al., 2005), outros achados reforçam que o comprometimento da função dessas células constitui o potencial mecanismo atribuído à severidade da doença (TRITT et al., 2008; YOU et al., 2005). Mais recentemente, um trabalho demonstrou que a depleção de células Treg com ciclofosfamida favorece a gravidade do processo de insulite e evolução da doença no modelo susceptível de T1D induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ - composto químico muito similar à molécula de glicose, com toxicidade específica para células β) (ZDRAVKOVIC et al., 2009).

Outro ponto que tem sido levantado diz respeito à plasticidade de células Treg. Dados recentes indicam que células Treg podem se tornar instáveis e perder a expressão de Foxp3 em sítios pancreáticos inflamados durante a progressão do DM1 (ZHOU *et al.*, 2009). No camundongo NOD, a falta de IL-2 nas ilhotas pancreáticas resulta na diminuição da expressão de CD25 e consequente redução na expressão de Foxp3. Essas células T “ex-Foxp3” produzem citocinas pró-inflamatórias, como IFN γ e IL-17 e possuem um potencial imunopatogênico quando transferidas *in vivo* (ZHOU *et al.*, 2009). O mesmo tem sido observado em pacientes com DM1, onde foi descrito um grande

aumento no número de células Treg Foxp3⁺ produtoras de IFN- γ e IL-17 (MCCLYMONT *et al.*, 2011). Neste sentido, tem sido demonstrado um importante papel na região demetilada específica para Treg (TSDR) na estabilidade de linfócitos T reguladores, em que quanto mais demetilada estiver esta região, maior foi a estabilidade da expressão de Foxp3. De maneira inversa, a metilação da região TSDR resulta em instabilidade da expressão de Foxp3 e conseqüente conversão para um fenótipo efetor, seja pela expressão de T-bet tornando-se uma célula Th1 ou ROR γ t tornando-se uma célula Th17 (HUEHN; POLANSKY; HAMANN, 2009; ZHOU *et al.*, 2009).

1.5 Linfócitos Th17: geração, caracterização e função no DM1

Recentemente, tornou-se claro que as citocinas IL-6 e TGF- β (*transforming growth factor*) podem induzir células T naïve de camundongos a se desenvolverem em linfócitos Th17, que são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição ROR γ t e pela produção de IL-17A e IL-17F (BETTELLI *et al.*, 2006; IVANOV *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006; VELDHONEN *et al.*, 2006). Em contraste, as citocinas caracterizadas como do perfil Th1 e Th2, IFN- γ e IL-4, respectivamente, foram demonstradas como sendo capazes de inibir o desenvolvimento de linfócitos Th17. Inicialmente, foi reportado que a citocina IL-23, que é membro da família IL-12 e um heterodímero formado pela subunidades IL-12/23 p40 e pela subunidade IL-23p19, é um fator importante para o desenvolvimento dos linfócitos Th17 (AGGARWAL *et al.*, 2003; HOEVE *et al.*, 2006). No entanto, linfócitos T naïve de camundongos não expressam o receptor de IL-23 e não se diferenciam em linfócitos Th17 na presença de IL-23 *in vitro*. Ao invés disso, IL-23 é essencial para a manutenção e/ou expansão de linfócitos Th17 murinos. Todavia, as citocinas IL-1 β e TNF- α são capazes de amplificar o desenvolvimento de linfócitos Th17 (KIDOYA *et al.*, 2005; SUTTON *et al.*, 2006). Neste sentido, a IL-1 β pode potencializar a produção de IL-17 induzida por TGF- β /IL-6 de maneira independente ou sinergicamente com IL-23. No entanto, nenhuma destas citocinas pode substituir o TGF- β ou IL-6 na geração de linfócitos Th17 em camundongos. Mais recentemente, outras moléculas também foram apontadas como capazes de influenciar o desenvolvimento de linfócitos Th17 murinos. Um exemplo é a molécula ICOS (*inducible co-stimulatory molecule*), que através de interações com a molécula PD-1 (*programmed death 1*), aumenta a produção de IL-17 (BAUQUET *et al.*, 2009). Outra

citocina que também é produzida por linfócitos Th17, IL-21, parece atuar de forma autócrina regulando positivamente o desenvolvimento de linfócitos Th17. Vale ressaltar que a IL-21 também possui diversas outras funções no sistema imune, como por exemplo, a regulação da resposta de linfócitos B (ETTINGER et al., 2005; ZHOU et al., 2007).

A descoberta de que IL-17 é altamente expressa no pâncreas de camundongos NOD (*nonobese diabetic*) foi um dos primeiros indícios sobre a associação de linfócitos Th17 e DM1 (VUKKADAPU et al., 2005). Posteriormente, foi demonstrado o papel de linfócitos Th17 na exacerbação da doença, através da observação de que IL-23, que pode promover a expansão destas células, induz DM1 se co-administrada com múltiplas doses de STZ (MENSAH-BROWN et al., 2006). Dados mais recentes afirmam que células T BDC2.5, que possuem o TCR transgênico específico para antígenos da ilhota pancreática, quando polarizadas para células Th17 *in vitro* induzem DM1 em camundongos linfopênicos NOD.scid (*nonobese diabetic / severe combined immunodeficiency*) (MARTIN-OROZCO et al., 2009). Em humanos, foi demonstrado o aumento de linfócitos Th17 no sangue periférico de crianças com DM1 (EMAMAULLEE et al., 2009). Além disso, Ferraro e colaboradores verificaram a presença de linfócitos Th17 no linfonodo pancreático e no sangue periférico de pacientes com DM1 (HONKANEN et al., 2010). Esses dados inferem para um possível papel de linfócitos Th17 na patogênese do DM1. No entanto, o mecanismo pelo qual estas células atuam na imunopatogenia da doença ainda permanece obscuro. No modelo experimental com camundongos NOD, foi mostrada a inibição da doença após o tratamento com anticorpos anti-IL-17 durante a fase efetora da doença (10 semanas de idade), e não durante a fase inicial da doença (menos de 5 semanas de idade) (EMAMAULLEE et al., 2009). Em contraste, foi demonstrado que camundongos NOD deficientes para IL-17A tiveram incidência e níveis de glicemia similares aos camundongos NOD selvagens (*wild type*). Este fato poderia ser explicado devido a expressão de outras citocinas da família IL-17, como a IL-17F. Recentemente, dois trabalhos confirmaram que linfócitos Th17 são importantes na patogênese do DM1, porém apenas após a transformação em linfócitos Th1 produtores de IFN γ (BENDING et al., 2009; MARTIN-OROZCO et al., 2009). Desta forma, apesar de que linfócitos Th17 e a citocina IL-17 parecem estar envolvidos no desenvolvimento

do DM1, o exato papel deste subtipo celular ainda não foi completamente elucidado (WAITE; SKOKOS, 2012).

Conforme mencionado anteriormente, apesar de diversos estudos sobre os mecanismos efetores da doença, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos envolvidos na quebra da auto-tolerância e desencadeamento do DM1. Neste contexto, o estudo sobre como a microbiota intestinal contribui para o desenvolvimento do diabetes tipo 1 aparece como um alvo interessante a ser estudado, como evidenciado por estudos recentes demonstrando seu papel em doenças autoimunes (SHAW et al., 2011), e um possível papel, apesar de ainda controverso, no DM1 (WEN et al., 2008). Portanto, torna-se cada vez mais necessário um maior entendimento sobre como a microbiota interage com o sistema imune, principalmente através dos receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como por exemplo, os *NOD-like receptors*, a fim de se estabelecer de forma precisa como ocorre a perda da auto-tolerância observada no diabetes tipo 1.

1.6 *Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs)*

A proteção de um organismo contra danos internos e externos depende da habilidade do sistema imune inato em discriminar entre a presença ou ausência de um sinal deletério. Os membros da família dos *NOD-like receptors* (NLRs), que são receptores intracelulares citosólicos, apresentam um importante papel na imunidade inata através da detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a morte celular (DAMPs). Os membros da família NLR podem ser divididos em dois grupos funcionais. Um grupo consiste em receptores como NLRP1, NLRP3, NLRP6 e NLRC4, os quais medeiam a montagem dos complexos chamados inflamassomas. Após reconhecerem seu respectivo ligante, esses receptores recrutam a proteína adaptadora do inflamassoma ASC (também conhecida como PYCARD), e da pró-caspase 1, formando um complexo molecular conhecido como inflamassoma. Esses complexos multi-proteicos medeiam a clivagem da pró-caspase 1 em caspase-1 ativa, que por sua vez irá clivar pró- IL-1 β e pró- IL-18 em suas formas biologicamente ativas (BERTRAND et al., 2011).

O outro grupo funcional do NLR inclui membros como NOD1 e NOD2, que são responsáveis por mediar a montagem de complexos que ativam as vias de sinalização dependentes de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), os quais estão relacionados com a transcrição gênica e expressão de citocinas tais como TNF- α , IL-6, pró-IL-1 β e pró-IL-18 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; HENNESSY; PARKER; O'NEILL, 2010). O receptor NOD2 está envolvido principalmente nas respostas imunes da mucosa intestinal. NOD2 é expresso em monócitos e células de Paneth, e reconhece peptideoglicanos (PGN) através do reconhecimento do dipeptídeo muramil (MDP), que é comum a bactérias gram-positivas e gram-negativas (INOHARA et al., 2005). Estudos constataram que mutações no receptor NOD2 estão associadas ao aumento da suscetibilidade a doença de Crohn na população ocidental (HUGOT et al., 2001). As mutações estão localizadas na região C-terminal rica em leucina (LRR) que é responsável pelo reconhecimento do ligante. Na doença de Crohn, pacientes com mutações no gene de NOD2 expressam menor quantidade de peptídeos antimicrobianos e α -defensinas (WEHKAMP et al., 2004). Além disso, camundongos deficientes para NOD2 são suscetíveis à infecção oral por *Listeria monocytogenes* decorrente da deficiência na expressão de α -defensinas antimicrobianas como Defcrs10 e Defcr4 no intestino (KOBAYASHI et al., 2005). Desta maneira, NOD2 é necessário para a expressão de peptídeos antimicrobianos pelas células de Paneth, uma vez que ele reconhece moléculas provenientes tanto de microrganismos patogênicos, como de bactérias comensais residentes. Além disso, dados recentes demonstram que NOD2 é essencial para a manutenção de linfócitos intraepiteliais intestinais (JIANG et al., 2013) e na manutenção da homeostase intestinal, uma vez que em animais deficientes para NOD2 ocorre a translocação de bactérias do lúmen para a camada epitelial intestinal (BENJAMIN et al., 2013). Em adição, foi demonstrado que a ausência de NOD2 em camundongos causa um processo denominado de disbiose, favorecendo o estabelecimento de uma microbiota tolerogênica que é capaz de induzir linfócitos T CD4⁺ LAP⁺ (*latent antigen protein*), os quais apresentam funções reguladoras (AMENDOLA et al., 2013).

Ao contrário de NOD2, que apresenta expressão celular bastante restrita, NOD1 é expresso de forma mais ubíqua, incluindo células epiteliais intestinais. NOD1 detecta PGN que contenham

diaminopimelato (DAP), que é encontrado principalmente em bactérias gram-negativas (GIRARDIN et al., 2003). Por exemplo, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* são reconhecidos por NOD1 in vitro. In vivo, camundongos deficientes em NOD1 são altamente suscetíveis à infecção por *Helicobacter pylori* (VIALA et al., 2004). Em camundongos NOD1^{-/-}, a produção de β -defensinas induzida por *H. pylori* foi abolida indicando que o receptor NOD1 expresso no epitélio intestinal possui um papel crítico na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas. Além disso, polimorfismos no gene *Nod1* estão associados a suscetibilidade de doenças inflamatórias como a doença de Crohn e colite ulcerativa (MCGOVERN et al., 2005).

De maneira interessante, a sinalização de NOD1 iniciada por bactérias comensais Gram-negativas é necessária para a formação do tecido linfóide associado à mucosa (MALT), particularmente de folículos linfóides isolados (FLIs) (BOUSKRA et al., 2008). Não obstante, PGN de bactérias comensais gram-negativas, como as do gênero *Bacteroides* é reconhecido por NOD1 nas células epiteliais, resultando na expressão de quimiocinas e no recrutamento de células necessárias para a formação dos FLIs. Foi mostrado também que a ativação de NOD1 pela microbiota intestinal durante condições basais é essencial para a ativação de neutrófilos em níveis sistêmicos e desta forma, protegendo o hospedeiro frente às infecções subsequentes. (CLARKE et al., 2010). Neste trabalho, neutrófilos provenientes da medula óssea de camundongos *germ free* demonstraram capacidade microbicida reduzida contra *Staphylococcus aureus*, confirmando a importância da microbiota em reprogramar a atividade funcional dos neutrófilos. Dessa maneira, NOD1 reconhece bactérias comensais e patogênicas e possui um papel crítico na regulação, ativação e organização tanto do sistema imune inato e adaptativo local quanto sistêmico.

1.8 NOD1 e NOD2: vias de sinalização intracelular

Após o reconhecimento de seus respectivos ligantes por NOD1 e NOD2 ocorre a translocação nuclear de NF- κ B e MAP quinases (MAPKs), que são responsáveis pela transcrição de numerosos genes envolvidos na resposta imune inata e na resposta imune adaptativa (STROBER et al., 2006).

Em linhas gerais, a detecção do microorganismo por receptores NOD1 e NOD2 resulta no recrutamento da quinase serina- treonina RICK, também denominada proteína de interação com receptor 2 (Rip2), por meio de interações CARD-CARD. Rip2 se liga diretamente ao modulador essencial de NF- κ B (NEMO), também conhecido como quinase γ inibidora de NF- κ B (IKK γ), uma subunidade regulatória de IKK, e promove a ubiquitinação e ativação das subunidades catalíticas IKK α e IKK β . Uma vez ativada, IKK fosforila o inibidor I κ B, induzindo sua degradação via proteassoma, ativando o fator de transcrição NF- κ B e ocasionando sua translocação nuclear (Figura 1). Além disso, Rip2 medeia o recrutamento da quinase TAK1 de modo dependente de ubiquitina, que é fator essencial para ativação de IKK. NOD1 e NOD2 induzem a poliubiquitinação de Rip2, que é necessário para o recrutamento de TAK1, uma quinase serina-treonina que forma um complexo com proteínas ligadas à ubiquitina (Tab1, Tab2 e/ou Tab3). Esse complexo ativa IKK por fosforilação em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo IL-1 β , TNF- α e vários ligantes de receptores tipo Toll. Além de sinalizar para a via que ativa NF- κ B, TAK1 também atua induzindo o aumento da expressão de NOD2 em resposta a estímulos por MDP (FRANCHI et al., 2009). De modo semelhante à via de ativação de NF- κ B, TAK1 e Rip2 são necessários na ativação de MAPKs mediada por NOD1 e NOD2. A ativação de NF- κ B e de MAPKs induz uma forte resposta inflamatória, decorrente da expressão e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, CXCL8, CXCL1, CXCL2, CCL2 e CCL5. A ativação de NOD1 induz recrutamento de neutrófilos *in vivo* e a ativação de NOD1 e NOD2 leva à produção de peptídeos antimicrobianos (FRANCHI et al., 2009; VOSS et al., 2006).

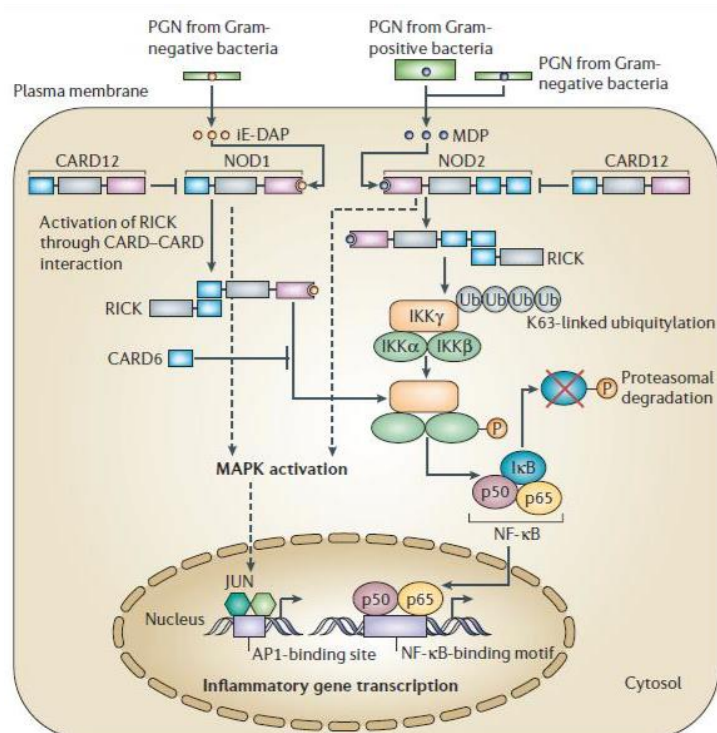


Figura 1. Via de sinalização de NOD1 e NOD2. O reconhecimento do MDP e de DAP por meio dos domínios ricos em leucina (LRR) ativa NOD2 e NOD1, respectivamente, e então há o recrutamento da quinase serina-treonina RICK através da interação entre os domínios CARD. No caso da ativação de NOD2, há a poliubiquitinação de IKK, bem como a fosforilação de IκB e a liberação de NF-κβ, que se desloca para o núcleo, promovendo a transcrição de diversos genes importantes para a resposta inflamatória. Além disso, a sinalização via NOD1 e NOD2 ativa proteínas quinases (MAPKs), como JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), ERK (*extracellular-signal-regulated kinases*) e p38 por mecanismos ainda não muito bem definidos. Fonte: Strober, W. *et al*, 2006.

1.9 Evidências do papel de NLRs na autoimunidade

Embora tenha sido verificada a implicação dos receptores NLRs na ativação dos mecanismos inatos devido ao reconhecimento de constituintes microbianos e/ou componentes endógenos, seu papel na regulação da resposta imune adaptativa no contexto de autoimunidade permanece incerto. Entretanto, parece provável seu envolvimento considerando o largo espectro de sinais endógenos que ativam os receptores NLRs (SCHRODER; TSCHOPP, 2010) e o importante papel das citocinas liberadas como decorrência de sua ativação, tais como IL-1β e IL-18, no direcionamento da resposta adaptativa. Em síntese, a IL-1β e a IL-18 agem em linfócitos de diferentes formas como através da

expressão do receptor para IL-2R e assim, prolongando a sobrevivência destas células, assim como aumentando a proliferação e diferenciação de linfócitos B (BEN-SASSON et al., 2009; MALISZEWSKI et al., 1990). Em adição, a IL-1 β e a IL-18 atuam no desvio e amplificação da resposta Th17 e Th1, respectivamente (CHUNG et al., 2009; GUO et al., 2009; HATA et al., 2004).

No modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), estudos sobre o papel do NLRP3 são controversos, uma vez que um grupo comprovou a importância deste receptor no desenvolvimento de células Th1 e Th17 e progressão da doença, enquanto outro reportou que não houve alteração de fenótipo em animais deficientes para NLRP3 (GRIS et al., 2010; SHAW et al., 2010). Também foi evidenciado que leucócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (SLE) apresentam elevada expressão de AIM2 (*absent in melanoma 2*), sugerindo que é um potencial candidato dentre os NLR em participar da patogênese do SLE, baseado na sua capacidade de reconhecer DNA citoplasmático (CHOUBEY et al., 2010; KIMKONG; AVIHINGSANON; HIRANKARN, 2009). Uma investigação recente observou forte associação de variantes de NLRP1 com vitiligo, uma doença autoimune causada pela destruição mediada por linfócitos T dos melanócitos e também a doenças autoimunes múltiplas associadas ao vitiligo (JIN et al., 2007). De maneira similar, foi demonstrada uma associação de mutações no gene NLRP1 e suscetibilidade genética à doença autoimune de Addison, uma condição autoimune associada com destruição do córtex adrenal que resulta em deficiência de mineralocorticoides, glicocorticoides e andrógenos pela glândula adrenal (ZURAWEK et al., 2010). Em pacientes diabéticos verificou-se também forte correlação entre polimorfismos do NLRP1 e NLRP3 com maior predisposição à doença (MAGITTA et al., 2009; PONTILLO et al., 2010). Embora a caspase-1 tenha relativamente menor significância em camundongos NOD diabéticos (SCHOTT et al., 2004), sua ativação ocasiona a degeneração de capilares da retina durante o DM1 (VINCENT; MOHR, 2007). Portanto, não se descarta a possibilidade de um papel proeminente dos receptores NLRP1 e NLRP3 na predisposição do DM1 ou mesmo na progressão de suas complicações em modelos murinos e em humanos.

Recentemente, foi mostrada a importância dos receptores NOD1 e NOD2 na polarização/expansão de linfócitos Th17 (GEDDES et al., 2011). Nesse estudo, foram utilizados

camundongos *Nod1^{-/-}Nod2^{-/-}* duplo *knockouts* que foram infectados por *Citrobacter rodentium* e *Salmonella typhimurium* e notaram que esses animais não desenvolveram uma resposta imune Th17 eficiente, comprovando que a geração de Th17 foi dependente de NOD1 e NOD2. Apesar desses dados, são poucos os relatos na literatura sobre o papel desse eixo NOD/Th17 na fisiopatologia de doenças autoimunes. A IL-1 β induz a produção de IL-6 e TNF- α , que por sua vez promovem a migração de células inflamatórias para o tecido inflamado (SIMS; SMITH, 2010). Além disso, IL-1 β também participa na geração e manutenção de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-17, que estão presentes na patogênese de inúmeras doenças autoimunes, em especial o DM1 (BEN-SASSON et al., 2009). Além desse estudo, foi demonstrado também que camundongos deficientes para as moléculas NOD1, NOD2 e RIP2 são resistentes a encefalomielite auto-imune experimental EAE, indicando um possível papel desses receptores no desencadeamento de processos auto-imunes (SHAW et al., 2011). Baseado nestas evidências, tivemos como objetivo investigar o exato papel dos receptores NOD1 e NOD2, e citocinas produzidas em decorrência da sua ativação, na indução da resposta inflamatória e polarização da resposta celular específica Treg/Th17. Em adição, também estudamos a importância destes receptores na plasticidade celular de linfócitos T reguladores e linfócitos Th17 em modelos experimentais de DM1.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal:

Investigar o perfil de expressão e o papel funcional dos receptores NOD1 e NOD2 na modulação da resposta imune celular durante a progressão do DM1 em modelos experimentais.

2.2 Objetivos específicos:

- 2.2.1 Determinar a cinética de expressão dos receptores NOD1, NOD2 e da molécula RIP2 nos linfonodos pancreáticos (LNP) durante o curso do DM1 induzido por estreptozotocina;
- 2.2.3. Estudar o papel dos receptores NOD1, NOD2 e da molécula RIP2 na suscetibilidade/resistência ao DM1, com ênfase no perfil de resposta Treg/Th17 e na conversão de linfócitos Treg/Th17/Th1;
- 2.2.4. Analisar se a ativação destes receptores altera a população de células mielóides (células dendríticas e macrófagos do perfil M1 e M2) nos LNP no DM1;
- 2.2.5. Conferir o efeito do MDP *in vitro* na diferenciação e/ou ativação de células dendríticas e macrófagos do perfil M1;
- 2.2.6 Correlacionar a expressão dos receptores NOD1, NOD2 e de fatores de transcrição do padrão Treg e Th17 nos LNP e no pâncreas em diferentes fases do DM1 (pré-diabética e diabética).
- 2.2.7 Verificar o possível envolvimento da microbiota intestinal na indução do DM1 experimental.

3. Metodologia experimental

3.1 Animais. Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos: selvagens (*wild type* – WT) e deficientes de NOD1, NOD2, RIP2 e IL-23p19, entre 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 20 e 25 gramas. Foram divididos da seguinte forma: grupo I (n = 3), animais WT controles, sem indução de DM1; grupo II (n = 3), animais deficientes (*knockouts* –KO) controles, sem indução de DM1; grupo III (n = 6), camundongos WT com DM1, e grupo IV (n = 6), animais *knockouts* com DM1. Todos os procedimentos realizados foram de acordo com os princípios propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e submetidos à análise e aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade de São Paulo (nº Processo 193/2011).

3.2 Indução de DM1 por STZ. Uma forma imunoinflamatória de diabetes, com características clínicas e imunohistológicas similares ao DM1 em humanos pode ser induzida em linhagens suscetíveis de camundongos através de injeções de múltiplas doses de STZ (N-methylnitrosocarbamoyl-D-glucosamine), $C_8H_{15}N_3O_7$ (KOLB, 1987; LIKE; ROSSINI, 1976). Os animais receberam cinco injeções i.p. diárias de STZ na concentração final de 40 mg/Kg de peso do animal em solução de citrato de sódio 25 mM, pH=4,0.

3.3 Monitoramento de glicemia. A glicemia foi avaliada em camundongos WT ou deficientes semanalmente à partir da primeira dose de STZ. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da base da cauda, de cada animal, e a taxa de glicose foi quantificada no aparelho Prestige LX (Prestige Smart System). Em todos os experimentos foram utilizados de 3- 6 animais por grupo, sendo que cada experimento foi repetido pelo menos 2 vezes.

3.4 Reação de imunoistoquímica. Os cortes histológicos de pâncreas foram cortados no micrótomo a 5 μ m, montado em lâminas de vidro e mantidos em forno seco a 60°C por 1 hora para adesão deste na lâmina. Em seguida, o material foi desparafinado e hidratado em uma bateria de xilol, álcool e água.

As reações inespecíficas foram bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA. À seguir, as amostras foram incubadas com anticorpo primário para as moléculas de interesse. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com biotina e em seguida, com estreptavidina (Vector, VA, USA). Finalmente, foi realizado a incubação com o substrato DAB (Research Genetics) e contra-coloração com hematoxilina.

3.5 Análise histopatológica. A avaliação histopatológica do infiltrado inflamatório foi realizada após coloração com hematoxilina e eosina (HE) de amostras fixadas em PBS/formaldeído 10%. Foram analisadas em média de 120 ilhotas por grupo, que receberam um *score* baseado no nível do infiltrado inflamatório, sendo classificadas em: sem insulite, peri-insulite ou insulite invasiva.

3.6 Avaliação e separação (*sorting*) de leucócitos por citometria de fluxo (FACS). A análise quantitativa e fenotípica de células extraídas do baço e LNP foi realizada por citometria de fluxo. Para caracterização fenotípica das células T reguladoras, foi avaliada a expressão dos seguintes marcadores: CD3, CD4 e Foxp3. Para detecção de Th17, a expressão de IL-17 em células CD4⁺ foi determinada após cultivo dos leucócitos dos linfonodos, *in vitro*, com forbol-miristato-acetato (PMA) e ionomicina, e subsequentemente brefeldina. Além disso, o infiltrado celular nos tecidos coletados foi também analisado para quantificação das células CD8⁺, CD11b⁺F4/80⁺ (macrófagos), CD11b⁺CD11c⁺ (células dendríticas) e GR1^{hi} (neutrófilos). As células foram lavadas e ressuspensas em Fc block (para bloquear ligações inespecíficas) por 30 minutos à 4°C e em seguida com 1µg de anticorpos monoclonais específicos aos marcadores determinados acima, conjugados com APC-Cy7, Percp, PECy7, FITC, PE, PerCP ou APC por 30 minutos à 4°C. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS contendo 1% de BSA e centrifugadas a 250 x g por 10 minutos. Os leucócitos foram adquiridos em FACSCanto II (Becton & Dickson®, San Jose, CA, USA) e as análises foram feitas usando o software FlowJo (Treestar®). Para realizar o *sorting* dos linfócitos Tc17, camundongos

ROR γ t^{gfp/+} (IVANOV et al., 2006) foram sacrificados, e as células T CD8⁺ROR γ t⁺ foram sorteadas utilizando o FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, USA).

3.7 Extração de RNA. A extração do RNA total das amostras dos LNP foi realizada utilizando-se o kit de extração de RNA (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram suspensas em 50 μ l de água deionizada e livre de nucleases, sendo então armazenadas a –70°C. A concentração de RNA foi determinada utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.8 Reações de PCR em tempo real. A expressão quantitativa dos genes das moléculas NOD1, NOD2, RIP2, Foxp3, ROR γ t e CCR6 foi analisada através de reações de PCR em tempo real, utilizando-se os sistemas SYBR Green em um aparelho GeneAmp 7700 (Applied Biosystems, USA). Primers adequados para tais reações foram criados à partir do programa Primer Express (Applied Biosystems). O sistema SYBR Green realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras (ABI Prism Software) através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado à partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagente SYBR Green, como determinado pelo fabricante. A reação básica de amplificação compreenderá 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, que foi empregada para a obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

3.9 Quantificação de citocinas por ELISA. A presença de citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-6, IL-17, IL-1 β , IL-12p40 e IL-23p19) nos tecidos pancreáticos foi analisada pelo método de ELISA. A quantificação foi realizada nos homogenatos dos tecidos em solução contendo inibidores de proteases, utilizando kits específicos para tais dosagens, de acordo com as especificações do fabricante (Kits R&D System).

3.10 Cultura de macrófagos da medula óssea (BMMs). A extração de macrófagos da medula óssea foi previamente descrita pelo nosso grupo de trabalho (MARIM et al., 2010). A medula óssea dos grupos dos animais em estudo foi retirada dos fêmures utilizando-se 3mL de meio RPMI incompleto. Após a homogeneização das células, 1,5mL dessa suspensão foi adicionada em placas para a aderência das células (Optilux™, BD Biosciences) de dimensões 100 x 20mm. Um volume de 10 mL de meio RPMI 10/30 foi adicionado a essas placas. O meio 20/30 é composto de 10% de soro bovino fetal e 30% de meio condicionado de células L929 (rico em GM-CSF). Essas células foram cultivadas na presença de 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, à 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Quatro dias depois foram acrescentados mais 10 mL de meio RPMI 10/30 às placas. No sétimo dia de cultivo, as células foram removidas pela lavagem das monocamadas com PBS 1X gelado, e a concentração celular acertada de acordo com o delineamento experimental. Essas células foram então cultivadas por 48 horas na presença de LPS (1 μ g/mL) e IFN γ (200ng/ml), e estimuladas ou não com MDP (10 μ g/ml). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas pelo método de ELISA.

3.11 Cultura de células dendríticas da medula óssea (BM-DCs). A geração de células dendríticas *in vitro* foi realizada à partir de precursores da medula óssea (BMDC) de camundongos WT ou NOD2^{-/-}. Brevemente, as células foram distribuídas em placas de Petri (Falcon 1029 placas; BD Discovery

Labware) numa concentração de 1×10^6 células/placa e cultivadas com meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, 2Mm de L-glutamina, 100U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, 0,05 mM de 2-ME) acrescido de 20ng/ml do recombinante murino GM-CSF (Sigma-Aldrich). No 3º dia de cultura, outros 20ng/ml de rGM-CSF foram adicionados na cultura e cultivadas por mais 3 dias. Em seguida, BM-DCs foram estimuladas ou não com LPS (200ng/ml) e/ou MDP (10 μ g/ml) por 24h. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas pelo método de ELISA.

3.12 Pré-tratamento com antibióticos e ensaio de translocação bacteriana. Camundongos C57BL/6 foram tratados com um coquetel de antibióticos por gavagem (1g/L ampicilina, 1g/L neomicina, 1g/L metronidazol e 500mg/L vancomicina) por duas semanas e posteriormente foram inoculados com estreptozotocina (STZ) ou solução veículo por 5 dias consecutivos (40mg/Kg/dia). Quinze dias após a administração de STZ, esses animais foram sacrificados e os linfonodos pancreáticos coletados, macerados e plaqueados em cultura em meio BHI por 48 horas para a quantificação de bactérias por CFU.

3. 13 Análise estatística. A análise estatística foi realizada por meio do programa Graphpad Prism. Foi utilizado o teste de *t* para avaliar as diferenças existentes entre dois grupos experimentais. Para comparação acima de dois grupos foi utilizado o teste ANOVA e como pós-teste foi utilizado o teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Deficiência do receptor NOD2 confere resistência ao DM1 experimental

Inicialmente, experimentos foram conduzidos para avaliar a expressão gênica dos receptores NOD1, NOD2 e da molécula adaptadora da via de sinalização destes receptores, RIP2, no linfonodo pancreático (LNP) após 7 e 15 da administração de STZ (diabéticos) ou veículo (não-diabéticos). Os resultados mostram claramente um aumento significativo da expressão relativa de NOD1, NOD2 e RIP2 no LNP de camundongos diabéticos após 15 dias da administração de STZ (Figura 1A-C). Para confirmar o papel dessas moléculas no DM1, foram utilizados camundongos deficientes para NOD1, NOD2 e RIP2. Portanto, camundongos NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-} e RIP2^{-/-} ou C57BL/6 foram injetados com múltiplas doses de STZ (40/mg/kg/dia) ou veículo por 5 dias. De acordo com nossos resultados, camundongos NOD2^{-/-} se tornaram resistentes ao DM1 induzido quimicamente (Figura 1E), uma vez que 50% dos animais NOD2^{-/-} não desenvolveram a doença quando comparado a 87,5% dos camundongos C57BL/6 selvagens. Entretanto, a incidência da doença em camundongos NOD1^{-/-}, como também RIP2^{-/-} foi muito similar aos animais selvagens (66,7% x 87,5% e 83,3% x 87,5% de incidência, respectivamente). Estudos recentes já sugeriram que uma molécula adaptadora alternativa além de RIP2 poderia estar mediando os mecanismos efetores do receptor NOD2 (RICKARD et al., 2013; SABBAH et al., 2009). Em conformidade com esses resultados, nossos dados sugerem que enquanto NOD1 e RIP2 são co-expressados no linfonodo pancreático de animais diabéticos ($R^2=0.9611$ e $p=0.0033$, Figura 1G), não foi observada correlação na expressão de NOD2 ($p=0.8180$; Figura 1H), sugerindo uma possível via alternativa ativada pelo receptor NOD2. Esses dados sugerem que NOD2, em uma via independente de RIP2, contribui para a patogênese do DM1.

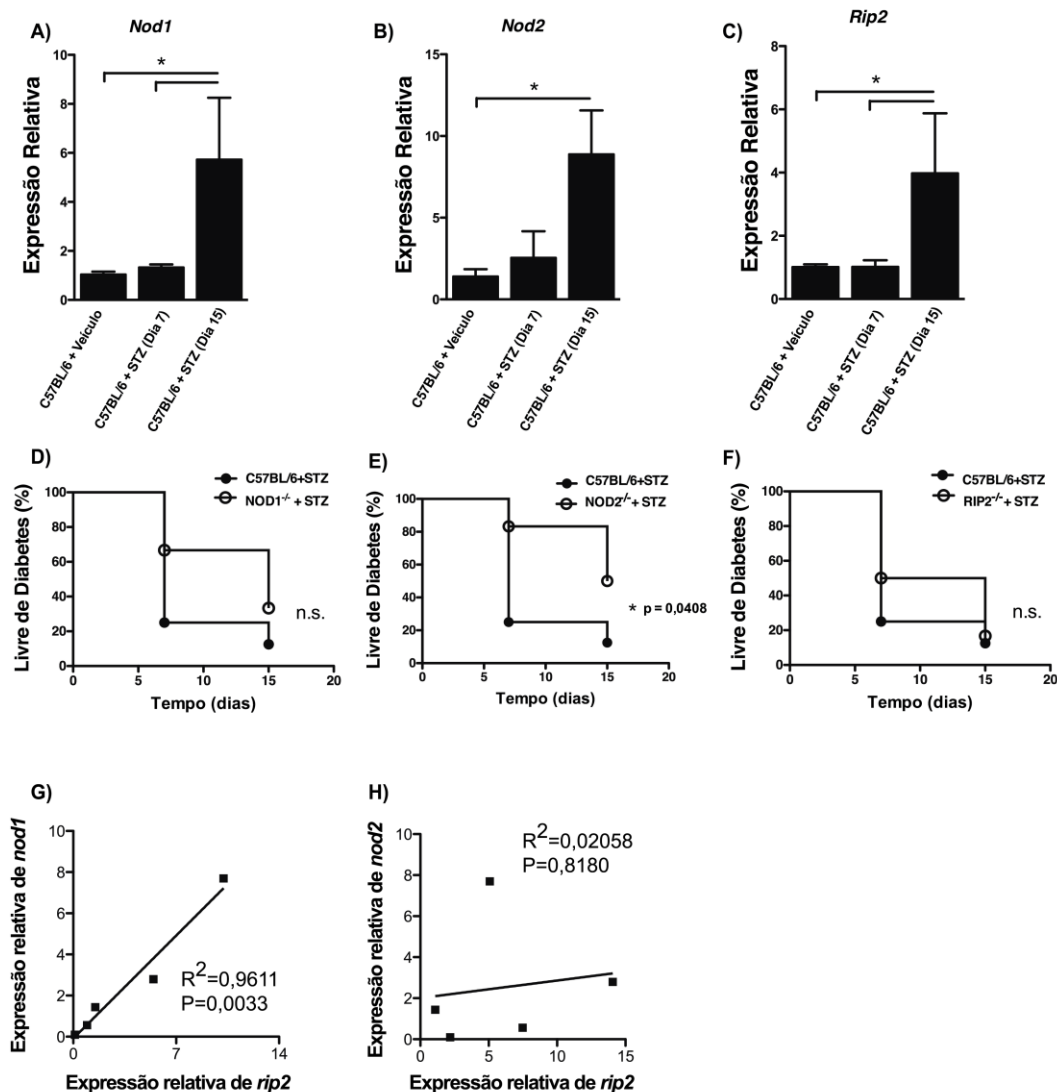


Figura 1. Cinética da expressão dos receptores NOD1, NOD2, da molécula RIP2 e monitoramento da incidência do DM1 experimental. Camundongos C57BL/6, NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-} e RIP2^{-/-} foram inoculados com estreptozotocina (STZ) ou solução veículo por 5 dias consecutivos (40mg/Kg/dia) e tiveram a incidência da doença monitorada durante 15 dias (D, E e F). Os animais C57BL/6 foram então sacrificados com 7 ou 15 dias os linfonodos pancreáticos foram coletado para a quantificação da expressão relativa de NOD1, NOD2 e RIP2 por RT-PCR (A, B e C) e análise da correlação entre essas moléculas (G e H), respectivamente. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *P≤0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

Ao avaliarmos os parâmetros clínicos do DM1 após 15 dias, verificamos que camundongos deficientes de NOD2 tiveram redução significativa dos níveis de glicose sanguínea (glicemia) quando comparados aos camundongos C57BL/6 (Figura 2A). Em adição, esses animais apresentaram moderado ganho de peso corporal neste período (Figura 2B). Apesar dos camundongos NOD1^{-/-} apresentarem manutenção do peso corporal (Figura 2D), os mesmos se tornaram hiperglicêmicos, sendo comprovado pelos altos níveis de glicemia (Figura 2C). Todavia, os camundongos RIP2^{-/-} apresentaram níveis de glicose (Figura 2E) e am perda de peso corporal semelhantes aos camundongos C57BL/6 após administração de STZ (Figura 2F).

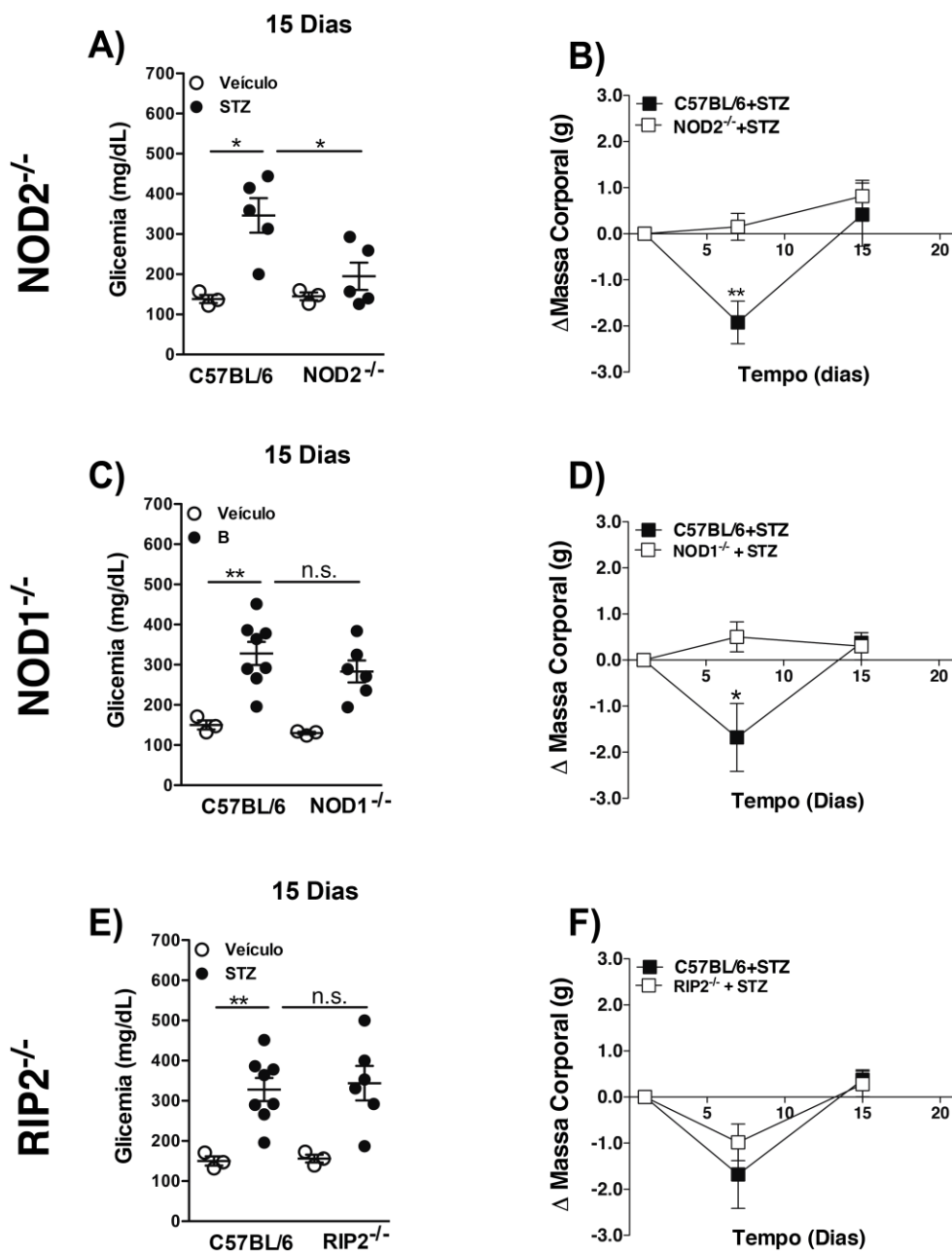


Figura 2. Avaliação da massa corporal e níveis de glicose sanguínea em camundongos durante o curso do DM1 experimental. Camundongos C57BL/6, NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-} e RIP2^{-/-} foram inoculados com estreptozotocina (STZ) ou solução veículo por 5 dias consecutivos (40mg/Kg/dia). Os animais tiveram seu peso corporal monitorados nos dias 1, 7 e 15 (B, D e F) e níveis de glicemia avaliados no dia 15 após STZ (A, C e E). Os resultados foram expressos como média ± EPM. *P≤0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.2 Deficiência do receptor NOD2 inibe o processo inflamatório (insulite) e a destruição das células β nas ilhotas pancreáticas

Em seguida, avaliamos o infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas denominado de insulite através de análises histopatológicas. Não observamos a presença de infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6 e NOD2^{-/-} não-diabéticos (Figura 3A e C). No entanto, camundongos C57BL/6 diabéticos apresentaram acentuado infiltrado celular no interior das ilhotas pancreáticas (Figura 3B), sendo caracterizado como insulite invasiva (Figura 3E). Por outro lado, camundongos deficientes de NOD2 demonstraram uma menor intensidade e severidade do infiltrado celular quando comparados com camundongos C57BL/6 administrados com STZ (Figuras 3D e E).

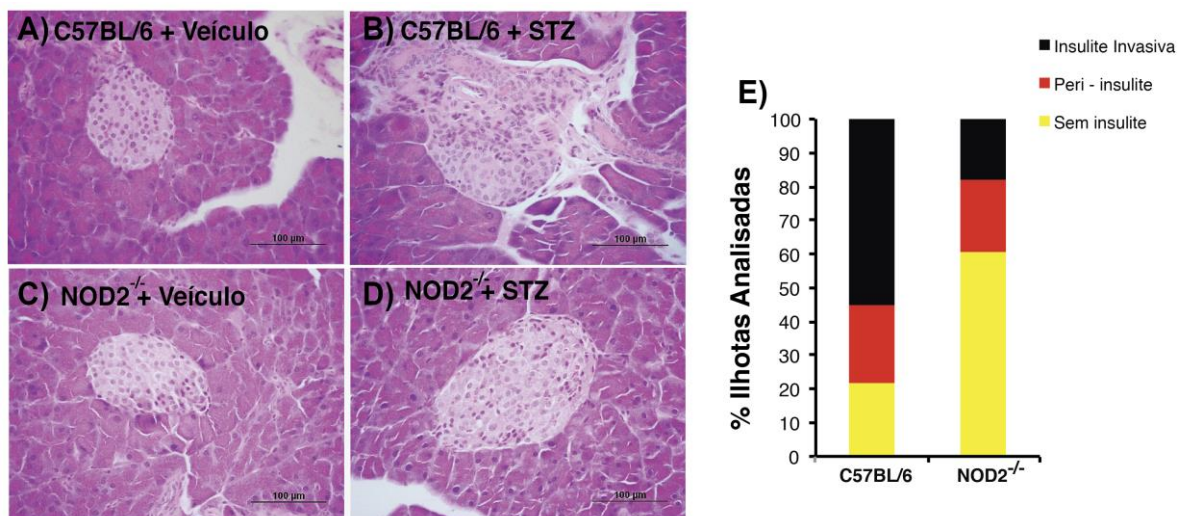


Figura 3. Análise histopatológica do pâncreas de camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6. Camundongos C57BL/6 e NOD2^{-/-} foram inoculados com estreptozotocina (STZ) ou solução veículo por 5 dias consecutivos (40mg/Kg/dia). Quinze dias após a administração de STZ, esses animais foram sacrificados e tiveram os pâncreas coletados para a análise do infiltrado inflamatório através de uma marcação por HE (aumento 40x) (A-D), sendo também avaliado a ausência ou presença de insulite periférica ou invasiva: (E).

Por fim, foi avaliada a integridade/atividade das células β produtoras de insulina presentes no pâncreas endócrino. Para isto, foi feita uma marcação para insulina pela técnica de imunistoquímica (Figura 4A-D) e a produção de insulina foi quantificada no soro destes animais (Figura 4E). Em camundongos C57BL/6 e NOD2^{-/-} não-diabéticos observamos a intensa marcação para insulina nas ilhotas pancreáticas (Figuras 4A e C) e níveis normais de insulina sérica (Figura 4E). Em contrapartida, em animais C57BL/6 diabéticos observamos diminuição significativa dos níveis de insulina no soro (Figura 4E) e reduzida marcação para insulina nas ilhotas pancreáticas (Figura 4B), indicando intensa destruição das células β produtoras de insulina. Entretanto, notamos a preservação das células β como comprovado pelo aumento da marcação para insulina e elevação dos níveis de insulina sérica em animais NOD2^{-/-} administrados com STZ, quando comparados aos C57BL/6.

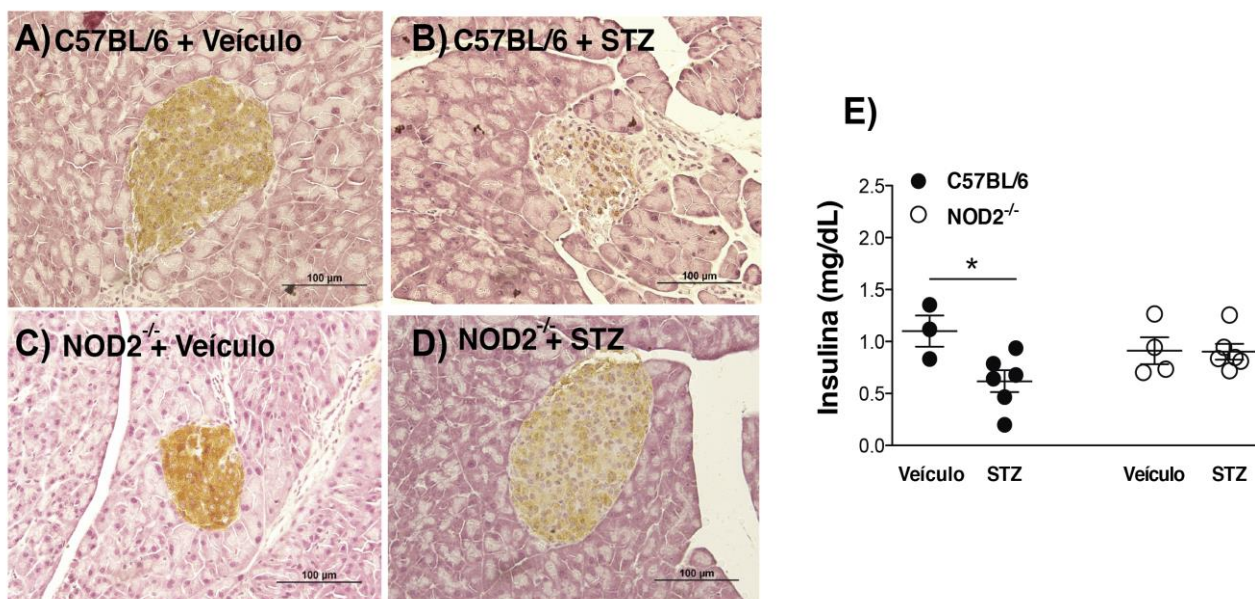


Figura 4. Expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas ou produção no soro de camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6 Camundongos C57BL/6 e NOD2^{-/-} foram inoculados com estreptozotocina (STZ) ou solução veículo por 5 dias consecutivos (40mg/Kg/dia). Quinze dias após a administração de STZ, esses animais foram sacrificados e o pâncreas e soro foram coletados para marcação de insulina por imunistoquímica (Figura 3A-D) e quantificação no soro (Figura 3E) através de kit comercial. Os resultados foram expressos como média ± SEM. *P ≤ 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.3 Alteração da população de linfócitos T expressando ROR γ t (Th17/Tc17) e Foxp3 (Treg) nos LNP e baço de camundongos deficientes de NOD2

Posteriormente, foram avaliados os parâmetros imunológicos em camundongos deficientes para NOD2 com o intuito de elucidar os mecanismos efetores que estariam contribuindo para a resistência desses animais ao DM1. Inicialmente, foi avaliada a frequência e o número absoluto de linfócitos Th7/Tc17 e Treg nos LNP e baço. Após 15 dias da primeira dose de STZ, foram coletados os LNP e baços para análise fenotípica por citometria de fluxo. Inicialmente, verificamos moderado aumento da porcentagem (Figura 5A) e do número absoluto (Figuras 5B-D) de linfócitos T reguladores (CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺), linfócitos Th17 (CD3⁺CD4⁺ROR γ t⁺) e Tc17 (CD3⁺CD8⁺ROR γ t⁺) nos LNP de animais C57BL/6 diabéticos. Porém, observamos marcante aumento da porcentagem de linfócitos T reguladores associado a uma diminuição significativa do número de linfócitos Th17 e Tc17 no LNP de camundongos NOD2^{-/-} quando comparado aos C57BL/6 administrados com STZ, tanto em frequência (Figura 5A), como em número absoluto (Figuras 5B-D). O aumento de linfócitos Treg, em detrimento de linfócitos Th17 e Tc17 levou ao aumento da razão de células Foxp3⁺:ROR γ t⁺(Figura 5E).

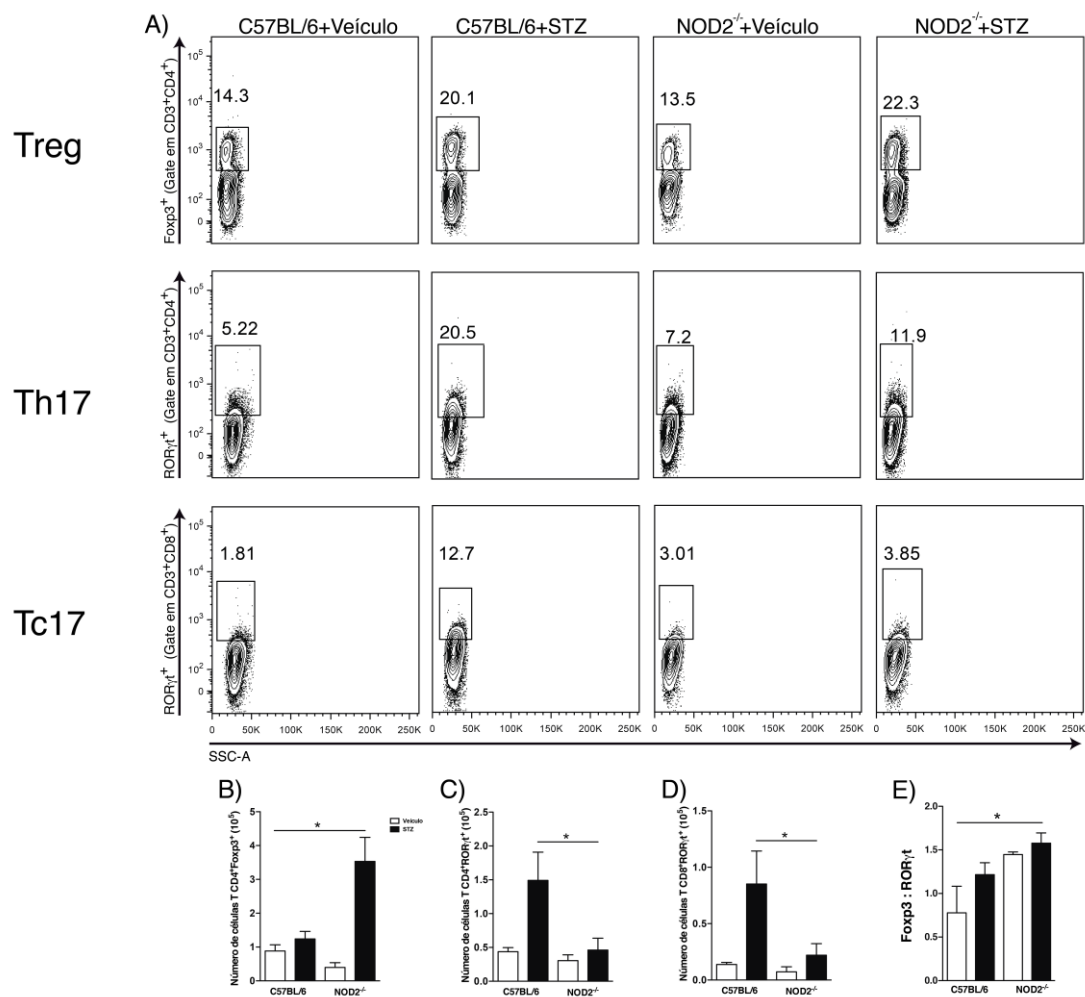


Figura 5. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg, Th17 e Tc17 em camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6. Células dos linfonodos pancreáticos (LNP) de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-} foram coletadas 15 dias após administração de estreptozotocina (STZ) ou solução veículo. A frequência (A) e número absoluto de células CD4⁺Foxp3⁺(B), CD4⁺RORγt⁺(B) CD8⁺RORγt⁺(C), e a razão Foxp3/RORγt (E) foi determinada. Para a análise da razão Foxp3/RORγt, a *gate* foi realizada em células positivas para CD3. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *P≤0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.4 Alteração da população de linfócitos T expressando IFN- γ (Th1 e T citotóxicos) nos LNP e baço de camundongos deficientes de NOD2

Posteriormente, foi analisada a presença destes subtipos celulares nos LNP (Figuras 6A e B) e baço (Figuras 7A e B), desta vez considerando linfócitos Th17 como células T CD4⁺ produtoras de IL-17 e Tc17 como células T CD8⁺ produtoras de IL-17. De fato, confirmamos uma queda significativa na frequência (Figura 6A) e no número absoluto (Figura 6B) de linfócitos Th17, Tc17, mas também de linfócitos Th1 (CD4⁺ produtores de IFN- γ) e T citotóxicos (CD8⁺ produtores de IFN- γ) nos LNP de animais NOD2 comparados aos C57BL/6 administrados com STZ (Figuras 6A e B). De maneira interessante, foi observado que estes subtipos celulares Th17, Tc17, Th1 e T citotóxicos encontram-se aumentados no baço de camundongos deficientes para NOD2 (Figuras 7A e B), indicando uma possível retenção destas células neste compartimento.

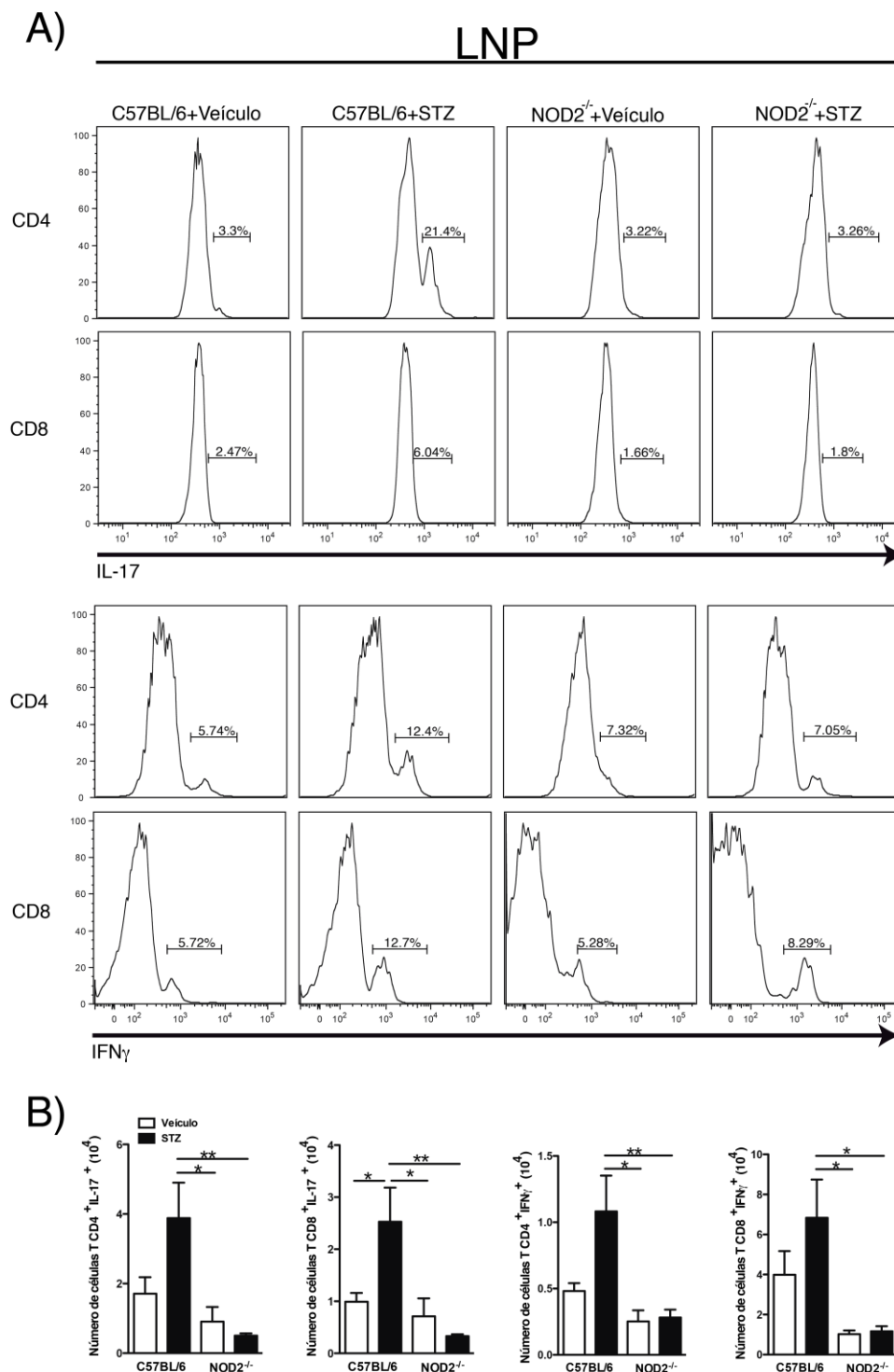


Figura 6. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Th17, Tc17, Th1 e T citotóxicos em camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6. Células dos linfonodos pancreáticos (LNP) de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-} foram coletadas 15 dias após a administração de estreptozotocina (STZ) ou solução veículo. A frequência (A) e número absoluto (B) de células CD4⁺IL-17⁺, CD8⁺IL-17⁺, CD4⁺IFN γ ⁺ e CD8⁺IFN γ ⁺ (E) foi determinada. Para a análise das populações, uma *gate* foi realizada em células positivas para CD3. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *P \leq 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

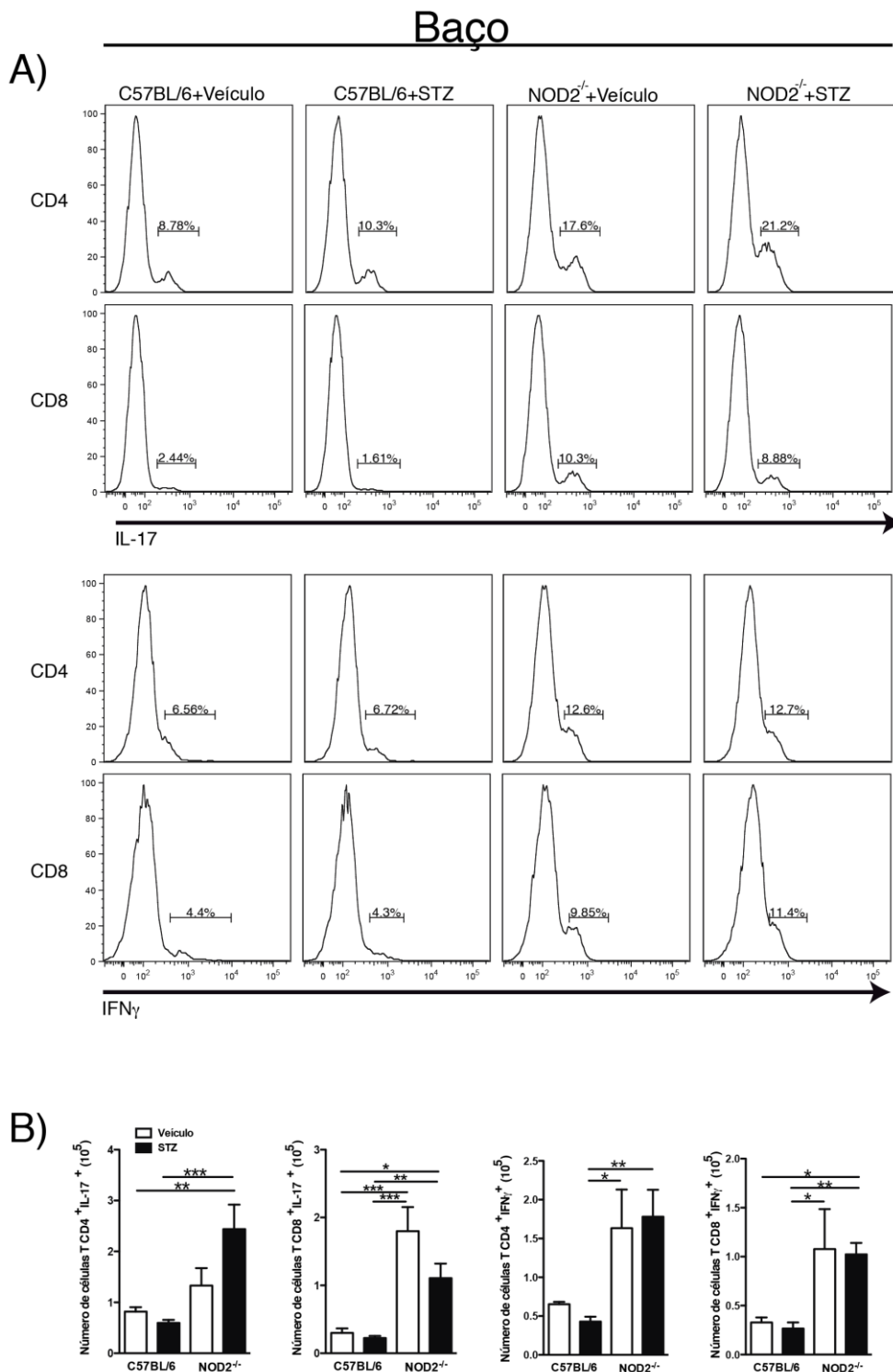


Figura 7. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Th17, Tc17, Th1 e T citotóxicos em camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6. Células do baço de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-} foram coletadas 15 dias após a administração de estreptozotocina (STZ) ou solução veículo. A frequência (A) e número absoluto (B) de células CD4⁺IL-17⁺, CD8⁺IL-17⁺, CD4⁺IFNγ⁺, e CD8⁺IFNγ⁺ foram determinadas. Para a análise das populações, uma *gate* foi realizada em células positivas para CD3. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *P≤0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.5 Diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento de IL-10 no tecido pancreático de camundongos deficientes de NOD2

O próximo passo foi avaliar o perfil da resposta inflamatória no tecido pancreático, que é o sítio da lesão tecidual no DM1. Utilizando o mesmo protocolo de indução da doença, 15 dias após a primeira dose de STZ, os camundongos foram sacrificados e tiveram o pâncreas coletado para a análise da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias pelo método de ELISA. Como observado na Figura 8A, houve aumento das citocinas do padrão Th17 (IL-6, IL-23 e IL-17) e Th1 (IFN- γ) no pâncreas de camundongos C57BL/6 diabéticos. Entretanto, foi verificada diminuição significativa na produção de IL-23 e IFN γ associada ao aumento na produção de IL-10 no tecido pancreático de camundongos deficientes para NOD2 administrados com STZ, quando comparados aos camundongos C57BL/6 diabéticos (Figura 8A). Também observamos que a deficiência do receptor NOD2 ocasionou elevação dos níveis de IL-4 no pâncreas quando comparado aos camundongos C57BL/6 submetidos ao esquema de STZ. Devido ao fato de observarmos menor produção de IL-23p19 no pâncreas de animais deficientes para NOD2, fomos avaliar também o papel desta citocina no DM1. Sendo assim, foram utilizados camundongos deficientes da IL-23p19 administrados com STZ e monitoramos os parâmetros clínicos relacionados ao DM1. De forma surpreendente, camundongos IL-23p19^{-/-} mostraram maior suscetibilidade ao DM1 em relação aos camundongos C57BL/6, sendo comprovado pelo alto índice de incidência da doença e perda de massa corporal (Figura 8B).

Pâncreas

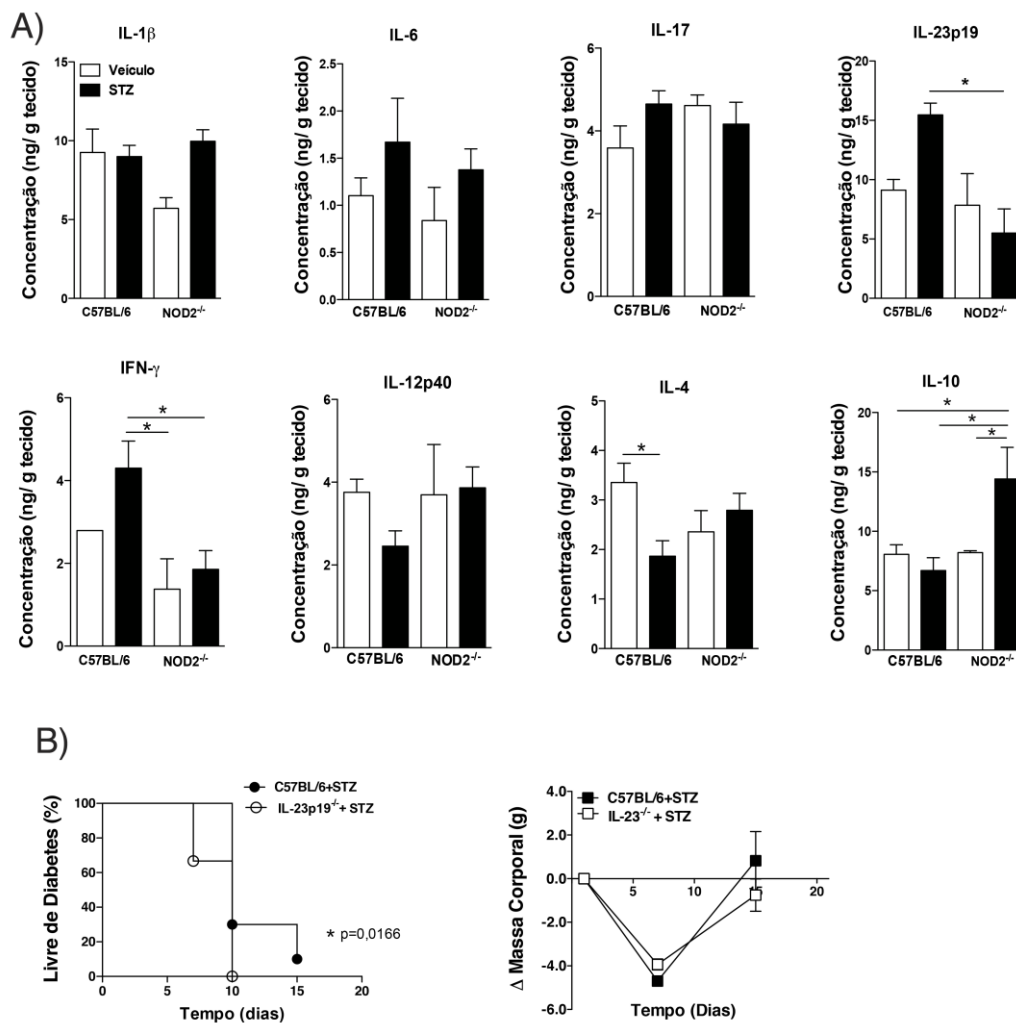


Figura 8. Detecção de citocinas no tecido pancreático de camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6 O tecido pancreático de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-} foi coletado 15 dias após a administração de estreptozotocina (STZ) ou solução veículo. As concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23p19, IFN γ , IL-12p40, IL-4 e IL-10 (A) foram determinadas pelo método de ELISA. Camundongos C57BL/6 ou IL-23p19^{-/-} foram inoculados com estreptozotocina (STZ) ou solução veículo por 5 dias consecutivos (40mg/Kg/dia) e tiveram a incidência e peso corporal monitorados durante 15 dias (B). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *P \leq 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.6 Inibição da população de linfócitos T duplo-positivos IL-17⁺IFN γ ⁺ e Foxp3⁺ROR γ t⁺ nos LNP de camundongos deficientes de NOD2

Embora os linfócitos Th17 e Tc17 estejam diminuídos nos LNP, não foi observada alteração da produção de IL-17 no pâncreas de animais deficientes para NOD2. Uma possível explicação é a de que essas células produtoras de IL-17 quando migram para o pâncreas se tornam incapazes de se converterem para células Th1, que parecem ser as células efetoras responsáveis pela lesão pancreática no modelo de DM1 (BENDING et al., 2009; MARTIN-OROZCO et al., 2009). Tal hipótese explicaria a diminuição de IFN- γ e a produção normal de IL-17 no pâncreas de animais NOD2^{-/-}. A fim de comprovar esta hipótese, foram conduzidos experimentos para se avaliar a plasticidade, tanto de linfócitos Th17, como também de linfócitos T reguladores. Para isto, foram analisadas as populações duplo-positivas (IL-17⁺IFN γ ⁺ e Foxp3⁺ROR γ t⁺) nos LNP de animais deficientes para NOD2 ou C57BL/6. Portanto, consideramos as células IL-17⁺IFN γ ⁺ como subtipos de linfócitos Th17 em fase de transição para o fenótipo Th1 e células Foxp3⁺ROR γ t⁺ como subtipos de linfócitos Treg para o fenótipo Th17. Como observado na Figura 9A, camundongos C57BL/6 diabéticos tiveram um aumento de células IL-17⁺IFN γ ⁺, indicando uma possível conversão de linfócitos Th17 para Th1. Porém, a porcentagem desta população celular diminuiu nos LNP de camundongos NOD2^{-/-}, sugerindo incapacidade de reprogramação em linfócitos Th1, que poderia ser um mecanismo atribuído a resistência desses animais. Além disso, camundongos C57BL/6 diabéticos apresentaram também maior frequência de linfócitos Foxp3⁺ROR γ t⁺. Em contraste, observamos decréscimo desta população em camundongos NOD2^{-/-} (Figura 9B).

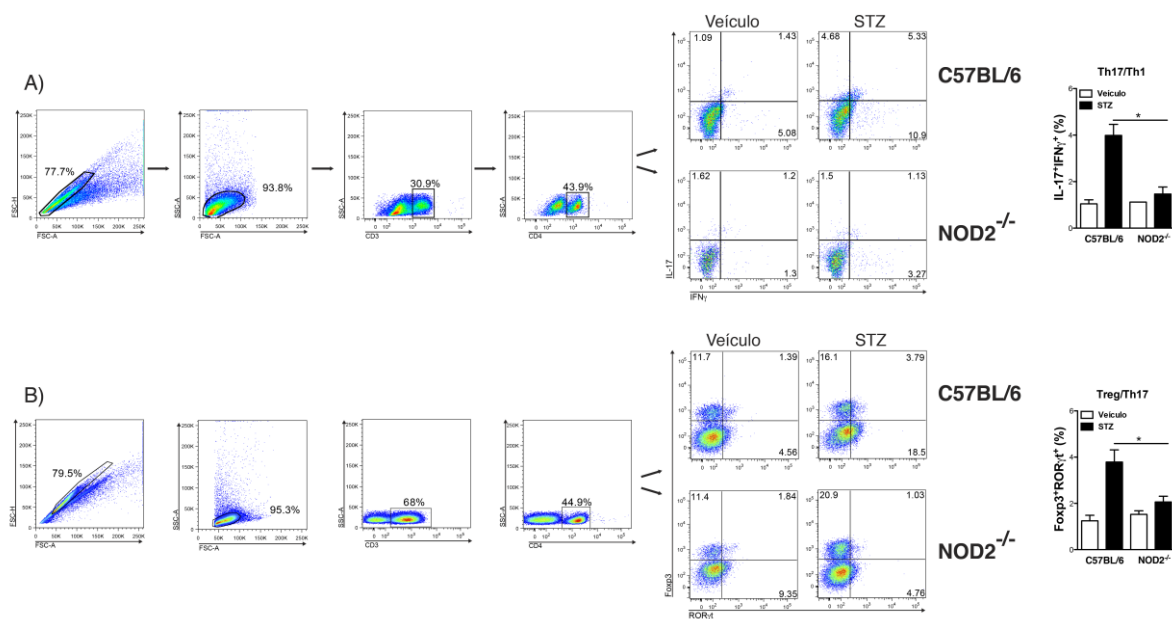


Figura 9. Porcentagem de linfócitos T duplo-positivos para Foxp3 e RORγt ou IL-17 e IFNγ em camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6 Células dos linfonodos pancreáticos (LNP) de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-} foram coletadas 15 dias após a administração de estreptozotocina (STZ) ou solução veículo. A frequência das populações duplo-positivas IL-17⁺IFNγ⁺ (A) ou Foxp3⁺RORγt⁺ (B) foi determinada. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *P<0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.7 Transferência de linfócitos Tc17 não reverteu a resistência de camundongos deficientes de NOD2 ao DM1

Por fim, como foi demonstrada uma diminuição de células Tc17 (T CD8⁺ produtoras de IL-17) no linfonodo pancreático de camundongos NOD2^{-/-} quando comparados com animais C57BL/6 (Figuras 5 e 6), resolvemos avaliar o possível papel desse subtipo celular na na patogênese do DM1. Para isto, células Tc17 foram isoladas por *sorting*, e 1x10⁶ células foram transferidas para camundongos NOD2^{-/-} administrados com STZ. Como demonstrado na Figura 10, não foram observadas diferenças significativas na incidência do DM1 (Figura 10A), nos níveis de glicemia (Figura 10B) e na razão Foxp3:RORγt (Figura 10C) em animais transferidos ou não com linfócitos Tc17. De forma geral, o número reduzido de linfócitos Tc17 não é um fator determinante na resistência observada em animais deficientes para NOD2 no DM1 experimental.

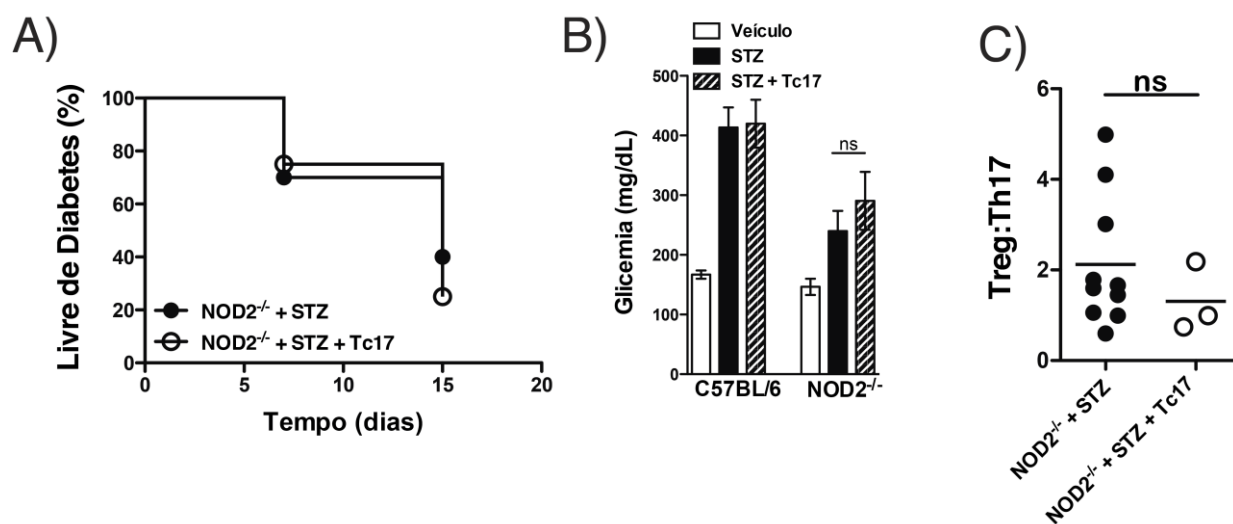


Figura 10. Transferência de linfócitos Tc17 para camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6 A concentração celular de 1×10^6 linfócitos Tc17 (CD3⁺CD4⁺CD8⁺ROR γ t⁺) foram isolados do baço e linfonodo pancreático de camundongos ROR γ t^{flp/+} e transferidos ou não para camundongos NOD2^{-/-} inoculados com estreptozotocina (STZ) no terceiro dia do início da administração de STZ. Esses animais tiveram a incidência monitorada (A) e os níveis de glicemia (B) determinados após 15 dias da administração de STZ. Os linfonodos pancreáticos também foram coletados para a análise da razão Foxp3/ROR γ t (C). A *gate* foi realizada em células CD3 positivas Foxp3 ou ROR γ t positivas. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $P \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.8 Aumento da população de células mielóides nos LNP de camundongos deficientes de NOD2

Nosso próximo passo foi avaliar a resposta imune inata em animais NOD2^{-/-} e identificar a população celular que poderia estar modulando a resposta imune nos LNP. Para tal, animais C57BL/6 ou deficientes para NOD2 foram administrados com STZ e após 15 dias tiveram os LNP coletados para a caracterização das populações de células mielóides presentes no local. Foi observado aumento tanto da frequência de células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺), como de macrófagos (CD11b⁺F4/80⁺), mas sem alteração de neutrófilos (GR1^{Hi}) (Figura 11A). De maneira interessante, camundongos NOD2^{-/-} não-diabéticos já possuem essas populações aumentadas nos LNP. Em paralelo, a fim de verificar a população de células mielóides ativadas, foi analisada a porcentagem de células expressando MHC II (*gate* feita em CD11b, contemplando tanto células dendríticas, como macrófagos). Como mostrado na Figura 11B, ambos os grupos de animais demonstraram porcentagens equivalentes de células positivas para MHC II após a indução da doença, descartando a possibilidade de que proteção dos animais deficientes para NOD2 seria atribuída a uma redução no perfil de ativação de células mielóides.

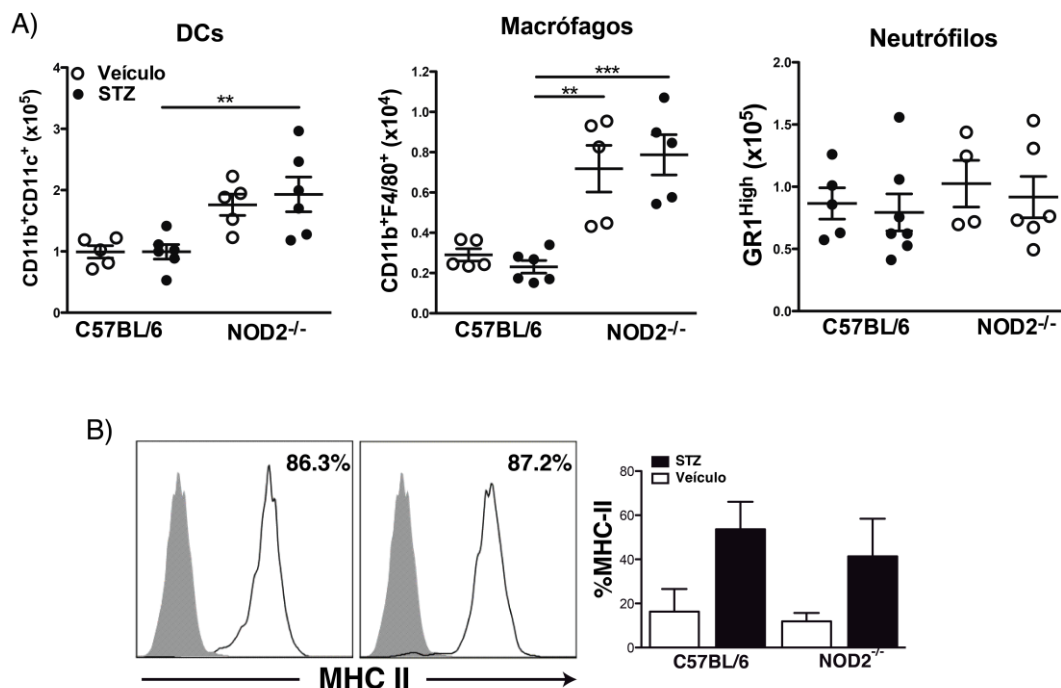


Figura 11. Número absoluto e porcentagem de células mielóides ativadas em animais NOD2^{-/-} e C57BL/6.

Os linfonodos pancreáticos (LNP) de camundongos não diabéticos, WT diabéticos NOD2^{-/-} foram coletados 15 dias após a administração de STZ ou solução veículo. As populações de células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺), macrófagos (CD11b⁺F4/80⁺) e neutrófilos (GR1^{Hi}) (A) e células CD11b⁺MHCII⁺ (B) nos linfonodo pancreáticos foram analisadas por citometria de fluxo. Números nos histogramas representam a porcentagem de células CD11b⁺ expressando MHC-II. Linhas pretas representam a expressão de MHC-II (*gate* em CD11b⁺) e linhas cinzas representam o isotipo controle. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *P≤0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.9 Reduzida expressão de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas derivadas de camundongos deficientes de NOD2

Em experimentos posteriores, tivemos como intuito avaliar a ativação de células dendríticas de animais deficientes para NOD2. Portanto, foram conduzidos experimentos *in vitro* utilizando células dendríticas (DCs) derivadas da medula óssea de animais NOD2^{-/-} ou C57BL/6. Essas células foram estimuladas ou não com LPS e/ou o ligante de NOD2, MDP, e a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-23p19, responsáveis pela diferenciação e manutenção do fenótipo Th17, e da citocina IL-12p40, envolvida na diferenciação para o perfil Th1, foi analisada. Como observado na Figura 12, o estímulo somente com MDP não foi capaz de induzir a produção de IL-1 β e IL-23p19, o que vai de acordo com dados da literatura de que NOD2 necessita atuar em sinergismo com receptores do tipo *toll* na expressão de citocinas pró-inflamatórias (BOUMA et al., 2012). De fato, quando estimuladas com MDP e LPS, DCs de camundongos C57BL/6 tiveram uma marcante produção de IL-1 β e IL-23p19 quando comparados com DCs estimuladas apenas com LPS. Também observamos que a produção destas citocinas por DCs obtidas de animais deficientes para NOD2 mostrou-se reduzida, mostrando que o efeito do MDP é dependente do receptor NOD2. De forma surpreendente, foi observado que a produção de IL-6 e IL-12p40 via NOD2 independe do sinergismo com receptores do tipo *toll*, uma vez que o estímulo apenas com MDP já induziu a produção destas citocinas e que esta resposta foi inibida em DCs que não expressam o receptor NOD2. De maneira interessante, o estímulo com LPS, na presença de MDP, causou reduzida produção de IL-6 *in vitro* comparado àquelas células estimuladas somente com LPS. De forma geral, estes resultados inferem que a ativação de DCs por MDP via o receptor NOD2 induz ou potencializa a produção de citocinas importantes para a diferenciação/manutenção de células Th1 e Th17, tais como IL-1 β , IL-6, IL-12p40 e IL-23p19.

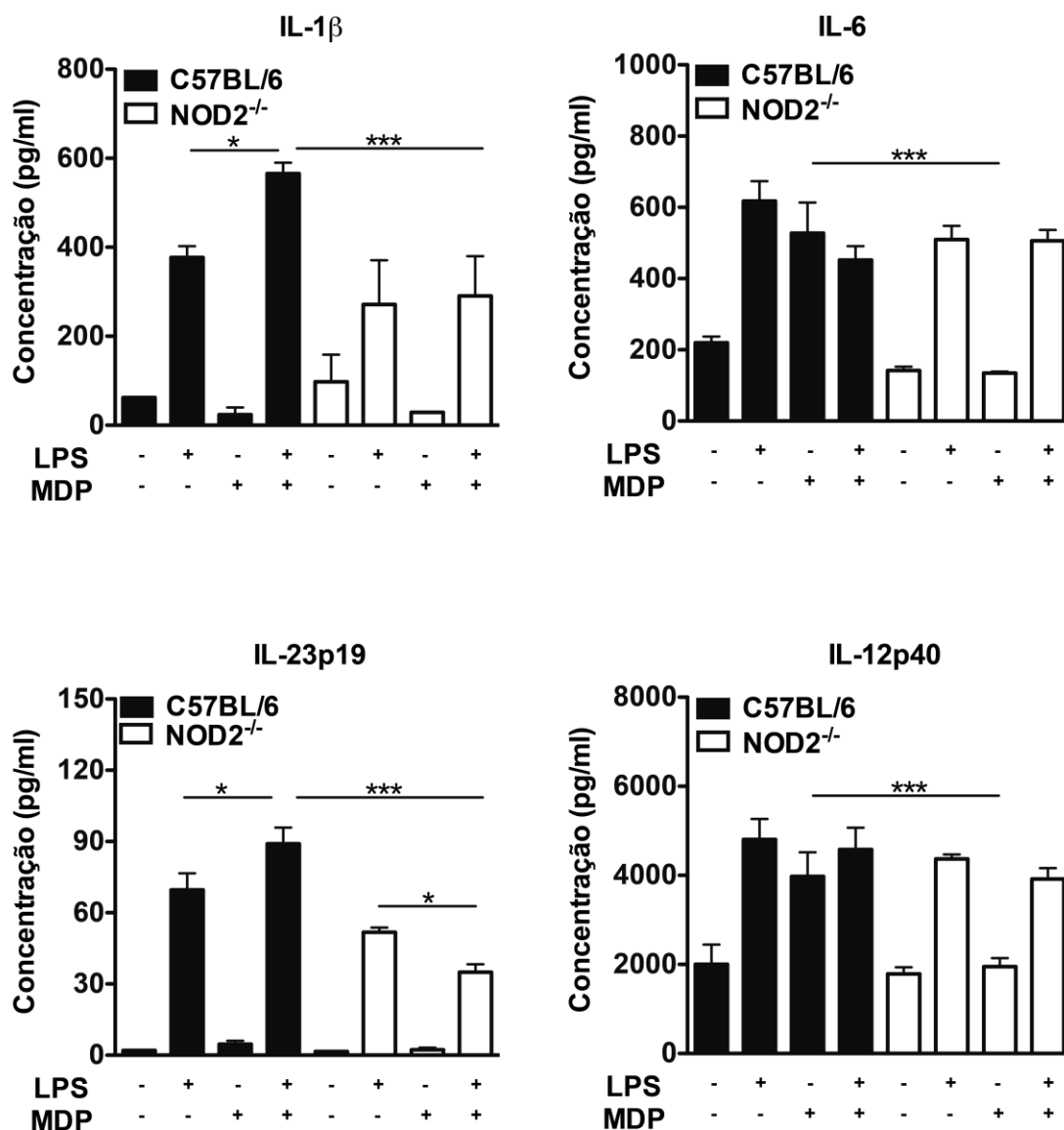


Figura 12. Produção de citocinas por células dendríticas (BM-DCs) derivadas da medula óssea de animais NOD2^{-/-} e C57BL/6 Células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-} foram estimuladas *in vitro* com LPS (200ng/ml) e/ou MDP (10 μ g/ml) por 48h. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi coletado para a quantificação de citocinas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *P \leq 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.10 Aumento de macrófagos do perfil M2 em detrimento de M1 nos LNP de camundongos deficientes de NOD2

Em seguida, resolvemos avaliar a importância de NOD2 na diferenciação de macrófagos do perfil M1 e M2 in vivo e in vitro. Primeiramente, foi analisado se os macrófagos presentes nos LNP de animais NOD2^{-/-} teriam um perfil anti-inflamatório, ou denominado de M2 em detrimento de perfil clássico ou M1. Para isto, animais NOD2^{-/-} ou C57BL/6 foram administrados com STZ e após 15 dias foram coletados os LNP para a análise do perfil M1/M2 por citometria de fluxo. Como observado nas Figuras 13A-B, animais C57BL/6 diabéticos tiveram aumento, tanto em frequência, como em número absoluto de macrófagos nos LNPs expressando TLR2, receptor expresso por macrófagos do perfil M1 (LIU et al., 2012), inclusive no modelo de DM1 por STZ (DEVARAJ et al., 2011). Em contraste, animais NOD2^{-/-} administrados com STZ mostraram aumento na frequência de macrófagos expressando CD206, receptor em macrófagos do perfil M2 e aumento significativo na razão M2:M1. Um fato importante é que macrófagos com perfil M2 encontram-se elevados em animais deficientes de NOD2 não-diabéticos. De forma geral, estes dados inferem que o receptor NOD2 desempenha um importante papel na polarização de macrófagos do perfil M1 durante a progressão do DM1.

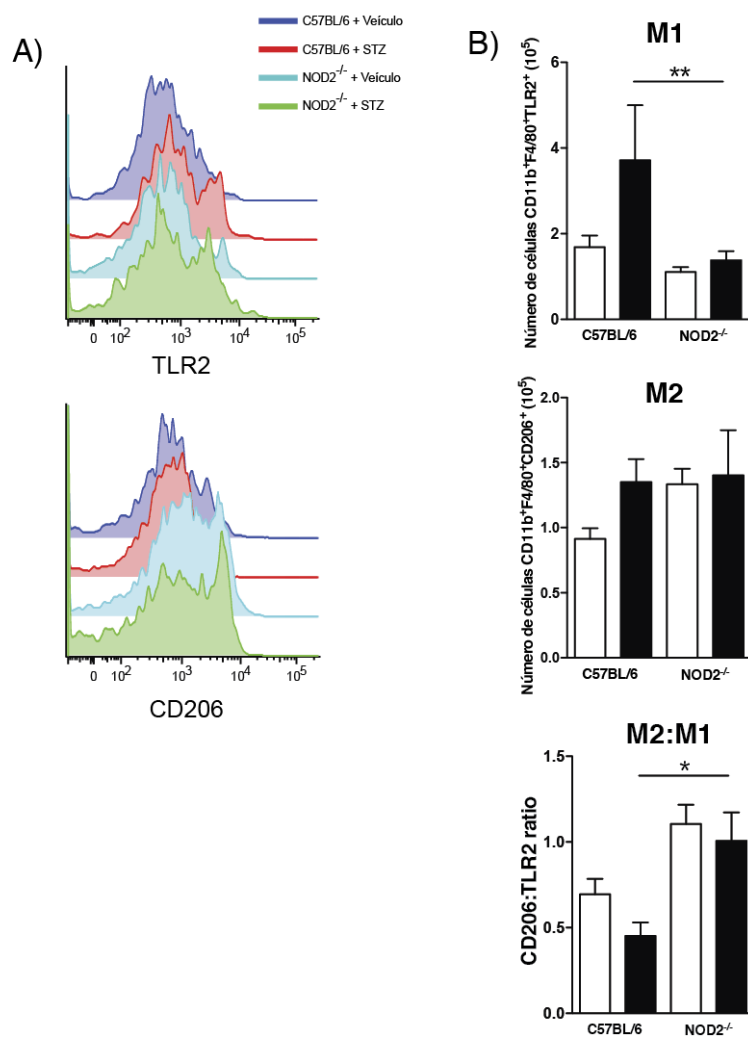


Figura 13. Análise fenotípica de macrófagos do perfil M1 e M2 em camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6 Células dos linfonodos pancreáticos de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-} foram coletadas 15 dias após a administração de estreptozotocina (STZ) ou solução veículo. Porcentagem (A) e número absoluto (B) de macrófagos M1 (CD11b⁺F4/80⁺TLR2⁺), M2 (CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺) e a razão M2:M1 (B) foi determinada. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *P≤0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.11 Efeito do MDP *in vitro* na polarização de macrófagos M1 e na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias

A próxima etapa foi avaliar se essa diferença na razão M2:M1 estaria relacionada a um defeito na polarização de macrófagos para um perfil M1 em camundongos deficientes para NOD2. Para tal finalidade, foram conduzidos experimentos *in vitro* utilizando macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-}, que foram polarizados para o perfil M1 pelo estímulo com IFN γ e LPS por 48 horas. Como observado na Figura 14A, macrófagos de animais C57BL/6 quando estimulados com MDP, na ausência de LPS e IFN- γ , apresentaram diminuição da expressão de CD206 e aumento da expressão de TLR2. Porém, houve uma redução significativa apenas após o estímulo por MDP juntamente com LPS e IFN- γ , indicando que MDP é necessário para uma polarização completa de macrófagos do perfil M1 em animais C57BL/6. Além disso, macrófagos derivados de camundongos NOD2^{-/-} estimulados com LPS e IFN γ também foram capazes de polarizar para o perfil M1, excluindo a possibilidade de um defeito intrínseco de macrófagos de animais deficientes de NOD2. Em adição, foi observado que macrófagos de camundongos C57BL/6 polarizados *in vitro* para um perfil M1 produzem maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (Figura 14B) e TNF α (Figura 14C), assim como o MDP potencializou a produção de ambas citocinas. De forma surpreendente, mesmo quando polarizados para um perfil pró-inflamatório, observamos uma robusta produção da citocina IL-10 por macrófagos de animais C57BL/6 (Figura 14D). Além da razão M2:M1 estar aumentada nos LNP de camundongos NOD2^{-/-}, o que não ocorre devido a uma falha na polarização para um perfil M1, os macrófagos de animais NOD2^{-/-} produzem elevadas quantidades de IL-10 após estímulo com LPS e IFN- γ . Contudo, a ativação de macrófagos com MDP influencia na polarização de macrófagos M1, assim como potencializa a produção das citocinas IL-1 β e TNF- α por estas células e desta forma, contribui para à suscetibilidade ao DM1.

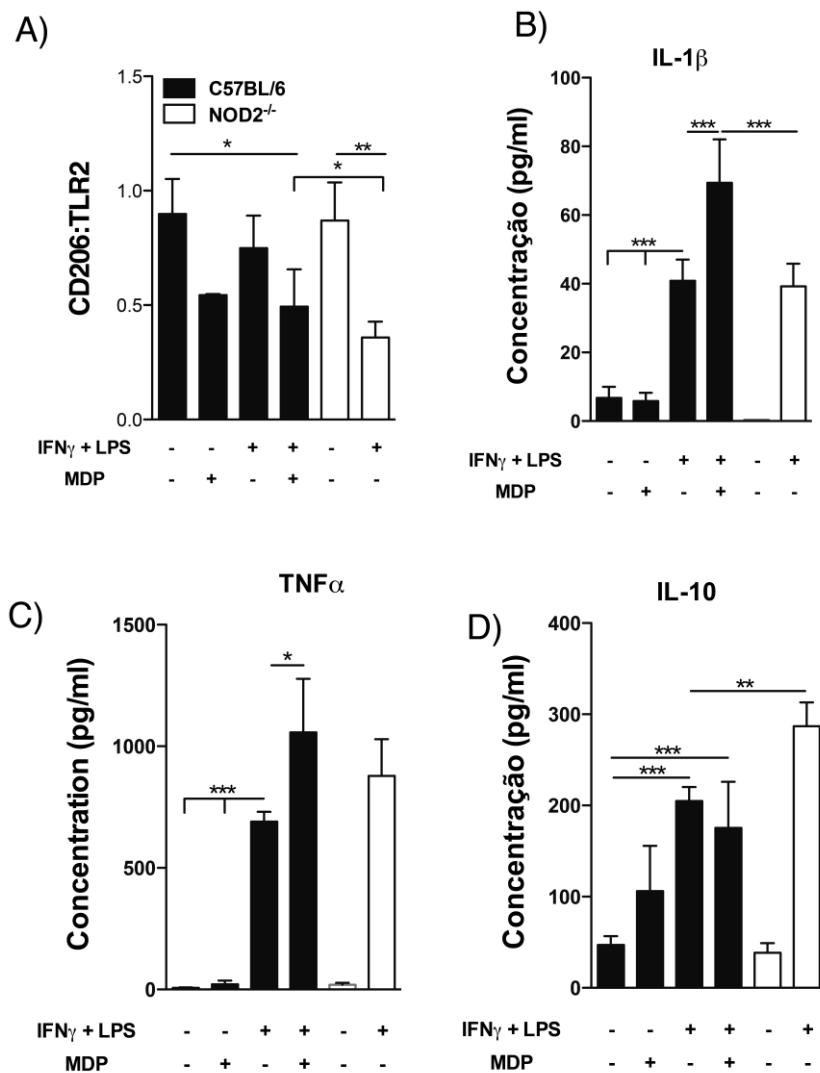


Figura 14. Diferenciação e produção de citocinas por macrófagos M1 de camundongos NOD2^{-/-} e C57BL/6 Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 ou NOD2^{-/-} foram polarizados para o perfil M1 com IFN γ (200ng/ml) e LPS (1 μ g/ml), na presença ou não de MDP (10 μ g/ml) por 48h. Posteriormente, o sobrenadante da cultura celular foi coletado para quantificação de citocinas por ELISA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *P \leq 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.12 Contribuição da microbiota intestinal na suscetibilidade ao DM1 experimental

O próximo passo foi avaliar como os componentes da microbiota intestinal estariam envolvidos no processo de suscetibilidade ao DM1, uma vez que o ligante do receptor NOD2 é de origem bacteriana. Para isto, animais C57BL/6 foram pré-tratados com um coquetel de antibióticos (ampicilina, metronidazol, vancomicina e neomicina) por duas semanas, que induz a depleção da microbiota intestinal, e posteriormente submetidos a indução de DM1 com STZ. Após 15 dias, coletamos os LNP para a quantificação de bactérias. Como observado pela Figura 15A, animais tratados com antibióticos se tornaram resistentes ao DM1, como evidenciado pela normalização dos níveis de glicemia. De forma interessante, foi observada a presença de bactérias para os LNPs de animais diabéticos, o que não ocorreu em animais tratados com antibióticos (Figura 15B). Estes resultados sugerem que uma possível translocação de bactérias do intestino para os LNP poderia ativar o receptor NOD2 e contribuir para o desenvolvimento do DM1.

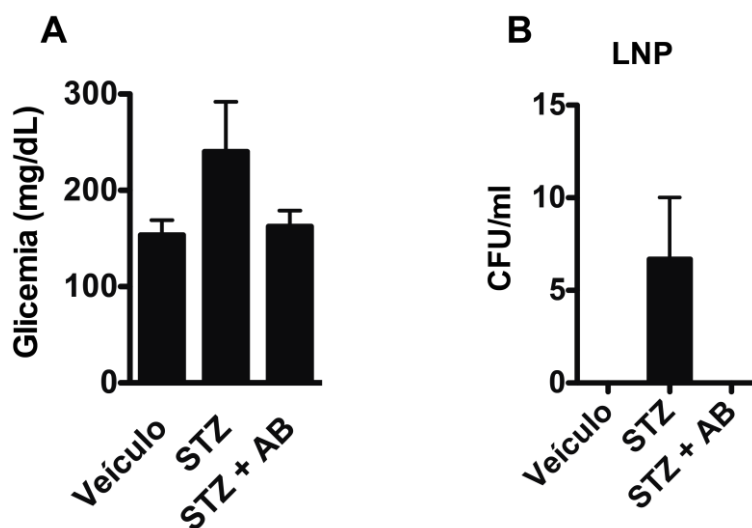
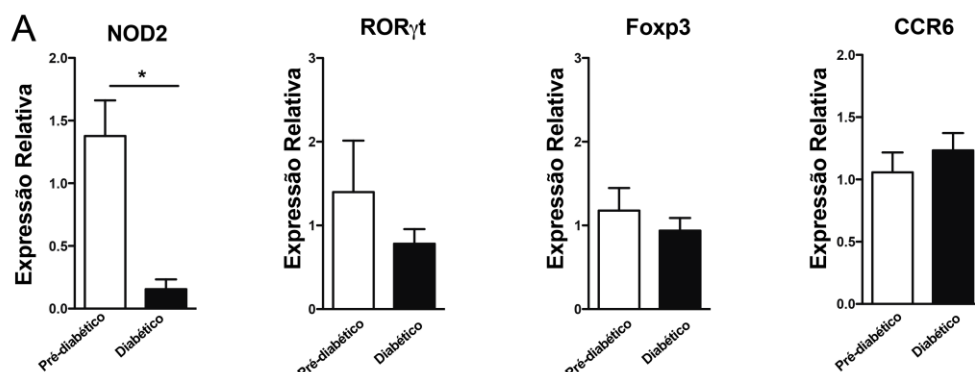


Figura 15. Efeito do pré-tratamento com antibióticos na hiperglicemia e translocação bacteriana no DM1. Camundongos C57BL/6 foram tratados com um coquetel de antibióticos por gavagem (1g/L ampicilina, 1g/L neomicina, 1g/L metronidazol e 500mg/L vancomicina) por duas semanas e posteriormente foram inoculados com estreptozotocina (STZ) ou solução veículo por 5 dias consecutivos (40mg/Kg/dia). Quinze dias após a administração de STZ, esses animais foram sacrificados e os linfonodos pancreáticos coletados, macerados e plaqueados em cultura em meio BHI por 48 horas para a quantificação de bactérias por CFU. Os resultados foram expressos como média \pm EPM.

4.13 Correlação da expressão gênica do receptor NOD2 e moléculas/receptores de linfócitos Treg/Th17 no modelo de DM1 determinado geneticamente

Contudo, foi avaliado a expressão do receptor NOD2 em camundongos diabéticos não obesos (NOD) em diferentes fases da doença. Portanto, amostras do pâncreas e LNP foram coletados com 8 (pré-diabetes) ou 20 semanas (diabetes estabelecida) e analisadas por RT-PCR. Foi observado que a expressão relativa de NOD2 ocorre principalmente na fase pré-diabética, tanto nos LNP como no pâncreas, o que confirma nossa hipótese de que o receptor seja importante na fase inicial da doença. Em contrapartida, a expressão do fator de transcrição ROR- γ t e do receptor CCR6 aumentou da maneira significativa no pâncreas na fase diabética, sugerindo a migração de linfócitos Th17 para o pâncreas. Adicionalmente, a expressão de Foxp3 também mostrou aumentada de maneira significativa no pâncreas durante este período, inferindo a migração destes subtipos celulares para o pâncreas durante a fase tardia da doença (Figura 16 A-B).

Linfonodo Pancreático



Pâncreas

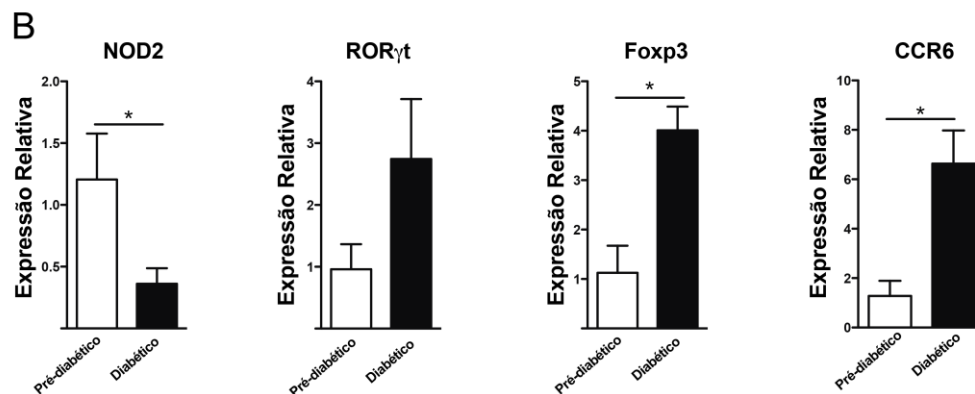


Figura 16. Expressão gênica do receptor NOD2 e moléculas associadas ao perfil Treg/Th17 por RT-PCR no modelo de DM1 geneticamente determinado. Células dos linfonodos pancreáticos ou o tecido pancreático de camundongos diabéticos não obesos (NOD) com 8 (pré-diabéticos) ou 20 semanas (diabéticos) foram coletados e a expressão relativa de NOD2, ROR γ t, Foxp3 e CCR6 foi analisada por RT-PCR. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *P \leq 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. Discussão

Estudos recentes têm apontado o papel dos receptores NOD1 e NOD2 no direcionamento da imunidade adaptativa, pois a ativação destes resulta na produção de TNF- α , IL-6, IL-23p19, pró-IL-1 β e pró-IL-18, que possuem extrema importância na diferenciação e manutenção de linfócitos Th17 e Th1. Mais recentemente, foi demonstrada a existência de uma correlação positiva entre ativação de receptores NLRs e o padrão de resposta Th17 (GEDDES et al., 2011). Nesse estudo, foi demonstrado usando camundongos *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} duplo *knockout* infectados por *C. rodentium* e *S. typhimurium* o comprometimento de uma resposta Th17 eficiente, comprovando que a geração/manutenção de linfócitos Th17 é dependente de NOD1 e NOD2. Apesar desses dados, são poucos os relatos na literatura sobre o papel desse eixo NLRs/Th17 na fisiopatologia das doenças autoimunes.

A citocina IL-6, juntamente com TGF β é responsável pela diferenciação inicial de células Th17 (BETTELLI et al., 2006). Já a citocina IL-23 é fundamental na expansão e manutenção do fenótipo Th17, uma vez que células T *naive* não expressam o receptor para IL-23 (MURPHY et al., 2003). Estudos têm apontado que a citocina IL-1 β é importante na indução de linfócitos Th17, assim como na produção de IL-6 e TNF α , que por sua vez promovem a migração de células inflamatórias para o tecido inflamado (SIMS; SMITH, 2010). Além disso, IL-1 β também participa na geração e manutenção de linfócitos T produtores de IFN γ , que estão presentes na patogênese de inúmeras doenças autoimunes, em especial o DM1 (BEN-SASSON et al., 2009). Apesar destas evidências, não existem relatos sobre o papel dos receptores NOD1 e NOD2 na polarização da resposta celular específica mediada por linfócitos Treg/Th17/Th1 no DM1.

Nossos dados iniciais demonstram claramente o aumento significativo da expressão de NOD1 e NOD2, além da molécula RIP2 nos linfonodos pancreáticos de animais diabéticos, indicando uma provável implicação de tais receptores na patogênese da doença. Para confirmar nossa hipótese, foi avaliado se a deficiência destas moléculas induziria a resistência ao DM1 induzido em resposta à administração de STZ. De fato, camundongos deficientes de NOD2 desenvolveram menor incidência da doença e hiperglicemia, uma vez que apenas 50% dos animais tornaram-se diabéticos. Além disso, esses animais apresentaram redução do infiltrado inflamatório e normalização dos níveis de insulina no soro. Entretanto, os animais NOD1 e RIP2 demonstraram suscetibilidade similar aos animais

C57BL/6 à indução da doença com STZ. Estes dados sugerem que talvez NOD2 atue através de outras vias de sinalização *downstream* que não envolve a molécula RIP2 (RICKARD et al., 2013).

O próximo passo foi avaliar se camundongos NOD2^{-/-} se tornaram mais resistentes ao DM1 devido a uma alteração no eixo Treg/Th17. Neste sentido, foi observada a diminuição na frequência e número de linfócitos Th17 e também de linfócitos T CD8⁺RORγt⁺ (Tc17). Em paralelo, evidenciamos aumento na frequência e no número de linfócitos Treg, o que resultou em aumento na razão de células Foxp3/RORγt e provavelmente, conferiu maior resistência desses animais ao DM1. Outro fato interessante observado foi que a diminuição de linfócitos Th17, Tc17, Th1 e T citotóxicos nos linfonodos pancreáticos correlacionou com aumento destes subtipos celulares no baço destes animais.. Estes achados sugerem que a deficiência de NOD2 causou uma possível retenção destas células no baço e subsequente falha na migração dessas células para os linfonodos pancreáticos.

Para verificar o perfil da resposta imune no sítio da lesão, dosamos as concentrações de diversas citocinas, tanto do perfil pró-inflamatório como anti-inflamatório, no pâncreas de animais deficientes de NOD2 e C57BL/6. Inicialmente, detectamos altos níveis de IL-6, IL-23p19, IL-17 e IFN-γ no tecido pancreático da camundongos C57BL/6 diabéticos. Entretanto, observamos a diminuição significativa dos níveis de citocinas importantes para manutenção do fenótipo Th17, como a IL-23p19 e de citocinas do perfil Th1, como o IFNγ, juntamente ao aumento da citocina IL-10. Além disso, notamos que animais C57BL/6 diabéticos tiveram reduzida produção de IL-4, enquanto esta se mostrou elevada em camundongos NOD2^{-/-} após administração de STZ. A citocina IL-4 já foi atribuída à resistência ao DM1 induzido quimicamente (WOOD; RAO; FREY, 1999), portanto, talvez ela seja um dos fatores determinantes na resistência observada em animais NOD2^{-/-}.

O fato de não haver alterações na produção da citocina IL-17 no pâncreas de animais deficientes para NOD2 nos levou a levantar a hipótese de que os linfócitos Th17 de animais NOD2^{-/-} migram normalmente para o sítio de lesão ou são incapazes de se converter para o perfil Th1. Neste contexto, uma constatação importante é que linfócitos Th17 desempenham capacidade diabetogênica em camundongos NOD.SCID somente após a conversão em células Th1 (BENDING et al., 2009;

MARTIN-OROZCO et al., 2009), possivelmente através da produção de IFN γ , que é extremamente citotóxico para as células β pancreáticas (CNOP et al., 2005). Tal hipótese explicaria a produção inalterada de IL-17 e diminuição de IFN- γ de animais NOD2^{-/-} no tecido pancreático comparado aos animais C57BL/6. A fim de comprovar esta hipótese, foram analisadas as populações duplo-positivas (IL-17⁺IFN γ ⁺ e Foxp3⁺ROR γ t⁺) no linfonodo pancreático de animais deficientes para NOD2 ou C57BL/6. Tais populações foram analisadas baseadas nas seguintes observações: (1) quando estimuladas *in vitro* com IL-12, células Th17 se convertem para Th1 gerando tanto células produtoras de IFN γ , como também células duplo positivas para IL-17 e IFN γ (BENDING et al., 2009; LEE et al., 2009). Portanto, consideramos essas células IL-17⁺IFN γ ⁺ como marcadores de linfócitos Th17 capazes de se converterem para o fenótipo Th1. De forma semelhante, células T *naive* quando estimuladas com TGF- β , expressam ROR- γ t depois de 1-2 dias, porém depois se tornam células ROR γ t⁺Foxp3⁺ que não produzem IL-17. Apenas quando há a presença da IL-6 é que essas células ROR γ t⁺Foxp3⁺ se tornam capazes de produzir IL-17 (LOCHNER et al., 2008). De forma geral, TGF- β parece ser o componente principal que inicia uma cascata de sinalização de diferenciação de linfócitos T *naive* dependente de ROR- γ t, que pode gerar tanto células T reguladoras (na presença de IL-10) ou Th17 (na presença de IL-6). Portanto, consideramos essas células Foxp3⁺ROR γ t⁺ como marcadores de linfócitos não comprometidos e com extrema plasticidade, capazes de se converterem em células Th17 ou Treg, dependendo do microambiente pró ou anti-inflamatório.

Camundongos C57BL/6 diabéticos tiveram aumento de células IL-17⁺IFN γ ⁺, indicando uma possível conversão de linfócitos Th17 para Th1, porém verificamos redução desta população em animais NOD2^{-/-}. Portanto, os linfócitos Th17 de camundongos NOD2^{-/-} parecem ser incapazes de se converterem para Th1. Além disso, camundongos C57BL/6 diabéticos também apresentaram maior frequência de linfócitos Foxp3⁺ROR γ t⁺, sugerindo que linfócitos T destes animais apresentam maior plasticidade e que, devido ao microambiente pró-inflamatório encontrado no pâncreas durante a progressão da doença, eles tendem a se converterem para o perfil Th17, como comprovado pelo aumento dessas células nos linfonodos pancreáticos. Já nos animais NOD2^{-/-}, verificamos marcante

diminuição dessa população duplo-positiva $\text{Foxp3}^+\text{ROR}\gamma\text{t}^+$, indicando que os linfócitos T de animais deficientes para NOD2 mantiveram o fenótipo regulador, como comprovado pela aumentada razão $\text{Foxp3}:\text{ROR}\gamma\text{t}$ nos linfonodos pancreáticos desses animais.

De forma geral, uma explicação plausível é que em condições homeostáticas a produção basal de TGF- β e IL-induz a prevalência de linfócitos T reguladores ($\text{Foxp3}^+\text{ROR}\gamma\text{t}^+$) residentes nos linfonodos e pâncreas, à fim de se estabelecer a tolerância periférica. A indução do DM1 com STZ leva a uma consequente produção de citocinas pró-inflamatórias no local, como a IL-6 e IL-1 β , por macrófagos, células endoteliais e até mesmo pelas próprias células β presentes nas ilhotas pancreáticas (KRISTIANSEN; MANDRUP-POULSEN, 2005; MAEDLER et al., 2002). Tal processo faz com que é importante para a quimiotaxia de neutrófilos via indução de CXCL-8 (MIYAMOTO et al., 2003) e monócitos para o sítio inflamado. Macrófagos e células dendríticas capturam esses auto-antígenos liberados pelas células β em apoptose/necrose e migram para o linfonodo pancreático, onde induzem a ativação dos linfócitos T naive e diferenciação para Th17 e Th1. Esses linfócitos retornam para o pâncreas, onde irão exercer sua função efetora como a destruição das células β . Já nos animais $\text{NOD2}^{-/-}$ a redução destes linfócitos $\text{Foxp3}^+\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ e aumento da razão $\text{Foxp3}:\text{ROR}\gamma\text{t}$ sugere maior estabilidade de linfócitos para um fenótipo regulador. Corroborando com estes dados, observamos que células dendríticas de animais deficientes para NOD2 produzem menos IL-1 β e IL-23p19, como demonstrado pelos nossos resultados *in vitro*, auxiliando assim na manutenção de linfócitos T reguladores.

Em camundongos $\text{NOD2}^{-/-}$, também observamos diminuição de células Tc17, que foram descritas como importantes na imunopatogenia em modelo de DM1 (SAXENA et al., 2012; YAOCHITE et al., 2012), o que poderia ser uma das causas da resistência desses animais $\text{NOD2}^{-/-}$. Portanto, transferimos linfócitos Tc17 para esses animais, porém não observamos a alteração do fenótipo após administração de STZ. Possivelmente, a falta de eficácia foi decorrente de quantidades insuficientes de células transferidas ou talvez seja necessária a co-transferência como células T CD4^+ , como demonstrado por Saxena e colaboradores (2012). Um artigo publicado recente demonstrou que a droga STZ contribui para uma diminuição das funções de linfócitos, gerando até mesmo um quadro de

linfopenia (Muller, Golshayan *et al.*, 2011). Sendo assim, avaliamos também se a supressão da resposta patogênica em camundongos NOD2^{-/-} era atribuída a reduzida ativação de células dentríticas e/ou macrófagos ativados. Para isto, foi realizada a marcação de MHC de classe II (um marcador de ativação) nessas células e quantificado a porcentagem destas populações positivas para esta molécula. Não observamos redução da porcentagem de células CD11b⁺MHCII⁺ nos linfonodos pancreáticos de animais deficientes de NOD2, descartando a possibilidade que este fenômeno poderia explicar a resistência destes animais ao DM1.

Em experimentos posteriores, resolvemos caracterizar fenotipicamente os macrófagos nos linfonodos pancreáticos a fim de comprovar se essas células teriam um perfil M2, ou seja, mais tolerogênico. Para isto, utilizamos o receptor de manose CD206 como um marcador do perfil M2 (VILLALTA *et al.*, 2009) e TLR2, que foi demonstrado como sendo um marcador de macrófagos pró-inflamatórios ou do perfil M1 (LIU *et al.*, 2012), inclusive no modelo de DM1 induzido por STZ (DEVARAJ *et al.*, 2011). De fato, foi observado o aumento da razão M2:M1 em animais deficientes de NOD2, indicando que na ausência de NOD2 ocorreu a prevalência de macrófagos do perfil M2, os quais poderiam contribuir para o estabelecimento da resposta anti-inflamatória e controle do DM1 observada nesses animais.

Considerando o fato de que o ligante de NOD2 é de origem bacteriana, resolvemos avaliar o possível papel da microbiota intestinal no mecanismo de resistência observada nesses animais. De fato, evidenciamos que a depleção da microbiota intestinal de animais C57BL/6 causou resistência ao DM1 induzido por STZ. De forma interessante, observamos também a presença de bactérias nos linfonodos pancreáticos de animais diabéticos, o que indica que a translocação bacteriana para o linfonodo pancreático poderia ativar o receptor NOD2 e poderia contribuir para o início da doença. Também realizamos uma análise comparativa da expressão de NOD2 em camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos. De fato, observamos alta expressão gênica do receptor na fase pré-diabética, seguido de um declínio após o estabelecimento da doença, indicando uma provável atuação deste receptor no desencadeamento da doença. Dessa forma, o uso de pró-bióticos ou pré-bióticos poderia representar novas intervenções preventivas ou terapêuticas para o DM1 em humanos.

Em síntese, nossos dados sugerem que o receptor NOD2 desempenha um importante papel na fase de indução do DM1 induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-23p19, resultando assim na diferenciação/conversão de linfócitos Th17/Th1 em detrimento de T reguladores, que por sua vez contribuem para a destruição das células β nas ilhotas pancreáticas e favorece o início do DM1.

6. Referências

AGGARWAL, S. et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, p. 1910–1914, 2003.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.

AMENDOLA, A et al. Nod2 deficiency is associated with an increased mucosal immunoregulatory response to commensal microorganisms. **Mucosal immunology**, v. 00, p. 1–14, 2013.

ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 447–485, 2005.

ATKINSON, M.; EISENBARTH, G. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, p. 221–229, 2001.

BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D. A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. **Immunological Reviews**, v. 212, p. 203–216, 2006.

BAILEY, R. et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 56, p. 2616–2621, 2007.

BAUQUET, A. T. et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. **Nature immunology**, v. 10, p. 167–175, 2009.

BEALES, P. E. et al. A multi-centre, blinded international trial of the effect of A(1) and A(2) beta-casein variants on diabetes incidence in two rodent models of spontaneous Type I diabetes. **Diabetologia**, v. 45, p. 1240–1246, 2002.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 551–589, 2009.

BELLE, T. O. M. L. V. A. N.; COPPIETERS, K. E. N. T.; HERRATH, M. G. V. O. N. Type 1 Diabetes : Etiology , Immunology , and Therapeutic Strategies. p. 79–118, 2011.

BEN-SASSON, S. Z. et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 17, p. 7119–7124, 2009.

BENDING, D. et al. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, p. 565–572, 2009.

BENJAMIN, J. L. et al. Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria. **Cell host & microbe**, v. 13, p. 723–34, 2013.

BERTRAND, M. J. M. et al. **NOD-like receptors and the innate immune system: Coping with danger, damage and death** Cytokine & Growth Factor Reviews, 2011.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235–238, 2006.

BLUESTONE, J. A.; TANG, Q. Therapeutic vaccination using CD4+CD25+ antigen-specific regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101 Suppl , p. 14622–14626, 2004.

BOUMA, G. et al. **Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses***Molecular Immunology*, 2012.

BOUSKRA, D. et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 507–510, 2008.

BRUNKOW, M. E. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 68–73, 2001.

BRUSKO, T. et al. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 56, p. 604–612, 2007.

CASTANO, L.; EISENBARTH, G. S. TYPE-I DIABETES : A Chronic Autoimmune Disease of. 1990.

CHOUBEY, D. et al. Interferon-inducible p200-family proteins as novel sensors of cytoplasmic DNA: role in inflammation and autoimmunity. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 30, n. 6, p. 371–380, 2010.

CHUNG, Y. et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 576–587, 2009.

CLARKE, T. B. et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. **Nature medicine**, v. 16, p. 228–231, 2010.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S97–107, 2005.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257–1265, 2007.

DEVARAJ, S. et al. Knockout of toll-like receptor-2 attenuates both the proinflammatory state of diabetes and incipient diabetic nephropathy. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, p. 1796–1804, 2011.

EMAMAULLEE, J. A. et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v. 58, p. 1302–1311, 2009.

ETTINGER, R. et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, p. 7867–7879, 2005.

FILIPPI, C. M.; VON HERRATH, M. G. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. **Diabetes**, v. 57, n. 11, p. 2863–71, nov. 2008.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 4, n. 4, p. 330–336, 2003.

- FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 331–337, 2005.
- FRANCHI, L. et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 106–128, 2009.
- GAVIN, M. A. et al. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. **Nat Immunol**, v. 3, n. 1, p. 33–41, 2002.
- GAVIN, M. A. et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. **Nature**, v. 445, n. 7129, p. 771–775, 2007.
- GEDDES, K. et al. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 837–844, 2011.
- GILLESPIE, K. M. et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. **Lancet**, v. 364, n. 9446, p. 1699–700, 2004.
- GIRARDIN, S. E. et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, p. 1584–1587, 2003.
- GRIS, D. et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 974–981, 2010.
- GUO, L. et al. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 32, p. 13463–13468, 2009.
- HATA, H. et al. IL-18 together with anti-CD3 antibody induces human Th1 cells to produce Th1- and Th2-cytokines and IL-8. **International Immunology**, v. 16, n. 12, p. 1733–1739, 2004.
- HENNESSY, E. J.; PARKER, A. E.; O'NEILL, L. A. J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, p. 293–307, 2010.
- HEROLD, K. C. et al. Diabetes induced with low doses of streptozotocin is mediated by V beta 8.2+ T-cells. **Diabetes**, v. 44, p. 354–359, 1995.
- HOEVE, M. A. et al. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. **European journal of immunology**, v. 36, p. 661–670, 2006.
- HONKANEN, J. et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. **J Immunol**, v. 185, p. 1959–1967, 2010.
- HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057–1061, 2003.
- HORWITZ, M. S. et al. Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, p. 79–87, 2002.

- HUEHN, J. et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 3, p. 303–313, 2004.
- HUEHN, J.; POLANSKY, J. K.; HAMANN, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? **Nature reviews. Immunology**, v. 9, p. 83–89, 2009.
- HUGOT, J. P. et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 599–603, 2001.
- INOHARA et al. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. **Annual review of biochemistry**, v. 74, p. 355–383, 2005.
- IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**, v. 126, p. 1121–1133, 2006.
- JAECKEL, E.; VON BOEHMER, H.; MANNS, M. P. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 306–310, 2005.
- JIANG, W. et al. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, p. 2465–76, 2013.
- JIN, Y. et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 12, p. 1216–1225, 2007.
- JULIER, C. et al. Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. **Nature**, v. 354, p. 155–159, 1991.
- KABAROWSKI, J. H. et al. Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, p. 702–705, 2001.
- KIDOYA, H. et al. Fas ligand induces cell-autonomous IL-23 production in dendritic cells, a mechanism for Fas ligand-induced IL-17 production. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, p. 8024–8031, 2005.
- KIMKONG, I.; AVIHINGSANON, Y.; HIRANKARN, N. Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real-time RT-PCR. **Lupus**, v. 18, n. 12, p. 1066–1072, 2009.
- KOBAYASHI, K. S. et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, p. 731–734, 2005.
- KOENEN, H. J.; FASSE, E.; JOOSTEN, I. CD27/CFSE-based ex vivo selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory T cells. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 7573–7583, 2005.
- KOLB, H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. **Diabetes/Metabolism Reviews**, v. 3, n. 3, p. 751–778, 1987.
- KOSTRABA, J. N. et al. Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. **Diabetes**, v. 42, p. 288–295, 1993.

- KRISTIANSEN, O. P.; MANDRUP-POULSEN, T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S114–S124, 2005.
- KUPILA, A. et al. Feasibility of genetic and immunological prediction of type I diabetes in a population-based birth cohort. **Diabetologia**, v. 44, p. 290–297, 2001.
- KYVIK, K. O.; GREEN, A.; BECK-NIELSEN, H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. **BMJ**, v. 311, p. 913–917, 1995.
- LEE, Y. K. et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. **Immunity**, v. 30, p. 92–107, 2009.
- LEHUEN, A. et al. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 501–513, 2010.
- LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 193, p. 415–417, 1976.
- LIM, H. W.; BROXMEYER, H. E.; KIM, C. H. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 2, p. 840–851, 2006.
- LIU, S. et al. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid β peptide to trigger neuroinflammatory activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, p. 1098–107, 2012.
- LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1701–1711, 2006.
- LOCHNER, M. et al. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ ROR γ t+ T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 6, p. 1381–93, 9 jun. 2008.
- MAEDLER, K. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, p. 851–860, 2002.
- MAGITTA, N. F. et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. **Genes and immunity**, v. 10, p. 120–124, 2009.
- MALISZEWSKI, C. R. et al. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 8, p. 3028–3033, 1990.
- MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v. 441, p. 231–234, 2006.
- MARIM, F. M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PloS one**, v. 5, p. e15263, 2010.
- MARTIN-OROZCO, N. et al. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. **European journal of immunology**, v. 39, p. 216–224, 2009.
- MCCLYMONT, S. A. et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. **J Immunol**, v. 186, p. 3918–3926, 2011.

- MCGOVERN, D. P. et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 10, p. 1245–1250, 2005.
- MCHUGH, R. S. et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **Immunity**, v. 16, n. 2, p. 311–323, 2002.
- MELLANBY, R. J. et al. Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. **Immunology**, v. 121, p. 15–28, 2007.
- MENSAH-BROWN, E. P. K. et al. IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. **European journal of immunology**, v. 36, p. 216–223, 2006.
- MIYAMOTO, M. et al. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, p. 4665–4672, 2003.
- MURPHY, C. A. et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1951–1957, 2003.
- NERUP, J. et al. HL-A ANTIGENS AND DIABETES MELLITUS. **Lancet**, v. 304, p. 864–866, 1974.
- NISTICÒ, L. et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. **Human molecular genetics**, v. 5, p. 1075–1080, 1996.
- O’GARRA, A. et al. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 10, p. 1372–1378, 2004.
- PATTERSON, C. C. et al. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet**, v. 373, p. 2027–2033, 2009.
- PICCIRILLO, C. A. et al. Control of type 1 autoimmune diabetes by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1051, p. 72–87, 2005.
- PONTILLO, A. et al. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. **Autoimmunity**, v. 43, n. 8, p. 583–589, 2010.
- POP, S. M. et al. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, p. 1333–1346, 2005.
- RANDOLPH, D. A.; FATHMAN, C. G. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 381–402, 2006.
- READ, S.; MALMSTROM, V.; POWRIE, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, p. 295–302, 2000.

- RICKARD, D. J. et al. Identification of benzimidazole diamides as selective inhibitors of the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) signaling pathway. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e69619, jan. 2013.
- RUPRECHT, C. R. et al. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 11, p. 1793–1803, 2005.
- SABBAH, A. et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. **Nature immunology**, v. 10, n. 10, p. 1073–80, out. 2009.
- SALOMON, B. et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. **Immunity**, v. 12, n. 4, p. 431–440, 2000.
- SAXENA, A. et al. Tc17 CD8+ T cells potentiate Th1-mediated autoimmune diabetes in a mouse model. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, p. 3140–9, 2012.
- SCHOTT, W. H. et al. Caspase-1 is not required for type 1 diabetes in the NOD mouse. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 99–104, 2004.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.
- SGOUROUDIS, E.; PICCIRILLO, C. A. Control of type 1 diabetes by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: lessons from mouse models and implications for human disease. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 25, n. 3, p. 208–218, 2009.
- SHAW, P. J. et al. Cutting edge: critical role for PYCARD/ASC in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 9, p. 4610–4614, 2010.
- SHAW, P. J. et al. Signaling via the RIP2 adaptor protein in central nervous system-infiltrating dendritic cells promotes inflammation and autoimmunity. **Immunity**, v. 34, p. 75–84, 2011.
- SHIMIZU, J. et al. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat Immunol**, v. 3, n. 2, p. 135–142, 2002.
- SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 89–102, 2010.
- STROBER, W. et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 1, p. 9–20, 2006.
- SUTTON, C. et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, p. 1685–1691, 2006.
- TAKAHASHI, T. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. **International Immunology**, v. 10, n. 12, p. 1969–1980, 1998.
- TAKEDA, I. et al. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 6, p. 3580–3589, 2004.
- TANG, Q. et al. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3348–3352, 2003.

- TRITT, M. et al. Functional waning of naturally occurring CD4⁺ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes. **Diabetes**, v. 57, p. 113–123, 2008.
- TUNG, K. S. et al. Regulatory T-cell, endogenous antigen and neonatal environment in the prevention and induction of autoimmune disease. **Immunological Reviews**, v. 182, p. 135–148, 2001.
- VAARALA, O.; ATKINSON, M. A.; NEU, J. The “perfect storm” for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. **Diabetes**, v. 57, n. 10, p. 2555–62, out. 2008.
- VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 79–118, 2011.
- VELDHOEN, M. et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, p. 179–189, 2006.
- VIALA, J. et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. **Nat Immunol**, v. 5, n. 11, p. 1166–1174, 2004.
- VIEIRA, P. L. et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 5986–5993, 2004.
- VILLALTA, S. A. et al. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. **Human molecular genetics**, v. 18, p. 482–496, 2009.
- VINCENT, J. A.; MOHR, S. Inhibition of caspase-1/interleukin-1beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 224–230, 2007.
- VOSS, E. et al. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 2005–2011, 2006.
- VUKKADAPU, S. S. et al. Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. **Physiological genomics**, v. 21, p. 201–211, 2005.
- WAITE, J. C.; SKOKOS, D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. **Int J Inflamm**, v. 2012, p. 819467, 2012.
- WEHKAMP, J. et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn’s disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1658–1664, 2004.
- WEN, L. et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. **Nature**, v. 455, p. 1109–1113, 2008.
- WOOD, S. C.; RAO, T. D.; FREY, A. B. Multidose Streptozotocin Induction of Diabetes in BALB / cBy Mice Induces a T Cell Proliferation Defect in Thymocytes Which Is. v. 12, p. 1–12, 1999.
- YAOCHITE, J. N. U. et al. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. **Immunobiology**, 2012.

YOU, S. et al. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. **Diabetes**, v. 54, p. 1415–1422, 2005.

ZDRAVKOVIC, N. et al. Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. **Molecular immunology**, v. 47, p. 28–36, 2009.

ZHOU, L. et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature immunology**, v. 8, p. 967–974, 2007.

ZHOU, X. et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. **Nature immunology**, v. 10, p. 1000–1007, 2009.

ZURAWEK, M. et al. A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease. **Human Immunology**, v. 71, n. 5, p. 530–534, 2010.