



DANIELLA DE FIGUEIREDO

**EXPRESSÃO DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS (CDKS 1,
2, 4 E 6) EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE CAMUNDONGOS NOD
(NON-OBESE DIABETIC) TRATADOS COM EXTRATO AQUOSO DAS
FOLHAS DE *PASSIFLORA ALATA***

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

DANIELLA DE FIGUEIREDO

**EXPRESSÃO DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS (CDKS 1,
2, 4 E 6) EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE CAMUNDONGOS NOD
(NON-OBESE DIABETIC) TRATADOS COM EXTRATO AQUOSO DAS
FOLHAS DE *PASSIFLORA ALATA***

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
DANIELLA DE FIGUEIREDO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER.**

Assinatura do Orientador

F469e Figueiredo, Daniella de, 1986-
Expressão de quinases dependentes de ciclinas (Cdks 1, 2, 4 e 6) em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD (non-obese diabetic) tratados com extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata* / Daniella de Figueiredo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Passiflora alata*. 2. Camundongos NOD. 3. Diabetes mellitus tipo 1. 4. Ciclo celular. I. Zollner, Ricardo de Lima, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cyclin-dependent kinase expression (Cdks 1, 2, 4 e 6) in pancreatic islets of NOD mice (non-obese diabetic) treated with *Passiflora alata* leaves aqueous extract

Palavras-chave em inglês:

Passiflora alata

NOD mice

Diabetes Mellitus, Type 1

Cell cycle

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Ângelo Rafael Carpinelli

Jose Antonio Rocha Gontijo

Data de defesa: 21-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

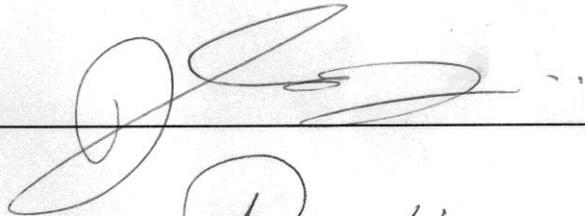
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DANIELLA DE FIGUEIREDO

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

MEMBROS:

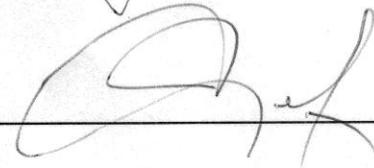
1. PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER



2. PROF. DR. ÂNGELO RAFAEL CARPINELLI



3. PROF. DR. JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21 de fevereiro de 2014

Meus agradecimentos

Aos meus queridos pais, por todo o apoio e por estarem sempre ao meu lado
incondicionalmente,
Meu irmão Juliano e minha cunhada Cintya, por todo carinho e dedicação,
Toda minha família e amigos, a quem devo tudo o que sou,
Meu orientador, Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, por todos os ensinamentos e orientação
ao longo destes anos, e também pela confiança em meu trabalho,
Nayara, Talita, Natália e Cinthia pela ajuda em todos os momentos, pelo companheirismo
absoluto e pela amizade,
Dr. Luís Gustavo Romani Fernandes, pela grande colaboração no desenvolvimento do
trabalho,
Instituto Agronômico de Campinas e Profa. Dra. Laura Maria Molina Meletti, pela atenção,
cuidado e disponibilidade de sempre,
Senhora Margarida, por toda ajuda, dedicação e companheirismo,
FAPESP, pela concessão de verba para o projeto de pesquisa, processo: 2011/06559-4 e
pela minha bolsa de estudos, processo: 2011/15763-4,
CAPES, pela concessão da bolsa de estudos nos meses finais do mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxix
1. INTRODUÇÃO	33
1.1. Diabetes mellitus	35
1.2. Camundongos NOD (non-obese diabetic)	36
1.3. <i>Passiflora alata</i> Curtis	36
1.4. Proteínas reguladoras do ciclo celular	39
2. HIPÓTESE	45
3. OBJETIVOS	49
3.1. Objetivo geral	51
3.2. Objetivos específicos	51
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1. Folhas do <i>Passiflora alata</i> Curtis	55
4.2. Extrato aquoso das folhas de <i>Passiflora alata</i> Curtis	55
4.3. Desenho experimental	55
4.4. Controle biológico do extrato aquoso das folhas de <i>P. alata</i>	56
4.5. Diagnóstico do diabetes e sacrifício dos animais	56
4.6. Avaliação histológica das ilhotas pancreáticas	57
4.7. Teste de tolerância a glicose	58
4.8. Detecção dos níveis de insulina sérica	58
4.9. Estresse oxidativo	59
4.10. Detecção de Células apoptóticas (Túnel)	59

4.11. Imunofenotipificação celular	60
4.12. Extração de ilhotas pancreáticas	61
4.13. Extração de TRNA e Síntese de cDNA	62
4.14. Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real	62
4.15. Ensaio de proliferação de linfócitos T na presença de extratos aquosos de <i>P. alata</i>	65
4.16. Análise estatística	66
4.17. Formatação do texto	67
5. RESULTADOS	69
5.1. Controle biológico do extrato aquoso	71
5.2. Efeito do tratamento com extrato aquoso sobre a manifestação do diabetes mellitus	71
5.3. Consumo do extrato aquoso de <i>P. alata</i>	72
5.4. Efeito do tratamento com as folhas de <i>P. alata</i> sobre o processo inflamatório e índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas	72
5.5. Teste de tolerância à glicose em camundongos NOD e BALB/c	76
5.6. Níveis de insulina sérica	77
5.7. Estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD	77
5.8. Células apoptóticas nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD	81
5.9. Imunofenotipificação dos infiltrados celulares nas ilhotas pancreáticas	81
5.10. Imunofenotipificação de células Insulina+, glucagon+, somatostatina+, GLP-1+ e dos fatores de transcrição NGN3+ e PDX-	

1+	88
5.11. Imunofenotipificação das CDKs 1, 2, 4 e 6	95
5.12. Expressão gênica – Insulina, Neuro-D, GLP-1, NGN3 e PDX-1	95
5.13. Expressão gênica – CDKs 1, 2, 4 e 6	106
5.14. Efeito do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i> na proliferação de linfócitos de camundongos NOD estimulados <i>in vitro</i>	106
6. DISCUSSÃO	109
7. CONCLUSÃO	125
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
9. REFERÊNCIAS	133
10. ANEXO	143

LISTA DE ABREVIATURA

APC	Células apresentadoras de antígenos (Antigen-presenting cell)
BSA	Soro Albumina Bovina (Bovin Serum Albumin)
CDK	Quinase dependente de ciclina (Cyclin-dependent kinase)
CDKI	Inibidor de quinase dependente de ciclina (Cyclin-dependent kinase inhibitor)
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
cDNA	DNA complementar
ConA	Concanavalina A
DM	Diabetes mellitus
DM-1	Diabetes mellitus tipo 1
DM-2	Diabetes mellitus tipo 2
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (Extracellular signal-regulated kinase)
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
HE	Hematoxilina Eosina
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (Major histocompatibility complex)

NGN3	Neurogenin 3
NK	Natural killer
NOD	Diabético não obeso (Non Obese Diabetic)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (Mitogen-activated protein kinases)
PBS	Tampão fosfato salina, ph 7.3 (Phosphate buffer saline)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDX-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
pRB	Proteína de Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucléico
SPF	Livre de patógenos comuns (Specific Pathogen Free)
TNF	Fator de necrose tumoral (Tumor necrosis fator)
TRNA	Ácido ribonucléico total
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Figura 1: Folha de <i>Passiflora alata</i> Curtis proveniente do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).	39
Figura 2A: Complexos CDK/Ciclina e sua atuação em diferentes fases do ciclo celular de mamíferos.	41
Figura 2B. Ciclo celular. Interação dos inibidores das famílias CIP/KIP (p21, p27 e p57) e INK4 (p15, p16, p18 e p19) com as CDKs correspondentes.	41
Figura 3: Frequência cumulativa sobre a incidência do diabetes nos camundongos NOD submetidos ao tratamento com extrato aquoso de <i>P.alata</i> ou controle. Observa-se que 38% (16/42) dos animais tratados ficaram diabéticos, enquanto 63,3% (19/30) apresentaram a doença. Diferença entre as frequências de 25,3%.	73
Figura 4: Consumo semanal de água e extrato aquoso dos camundongos NOD. Consumo de água 32,7±3,06 mL/animal; Consumo de extrato aquoso 33,4±2,4 mL/animal. Teste estatístico <i>t-Student</i> , com marcador estatístico “a”.	73
Figura 5: Imagem representativa de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em diferentes graus de infiltração celular. A) Grau 0 (0%); B) Grau 1 (< 25%); C) Grau 2 (25 - 80%); D) Grau 3 (> 80%); E) Grau 4 (100%).	74
Figura 6: Gráfico representativo da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongo NOD controle (n=5), diabético (n=5), NOD <i>P.alata</i> (n=5). Número de ilhotas analisadas em cada grupo = 300.	75
Figura 7: Gráfico representativo do Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD dos grupos controle, diabético e <i>P.alata</i> , com valores referentes ao índice de infiltrado e erro padrão, respectivamente, 0,6389±0,05, 0,6584±0,01 e 0,5675±0,05. Os resultados estão expressos por média ± erro padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. NOD controle (n=5); diabético (n=5); NOD <i>P.alata</i> (n=5). 300 ilhotas foram analisadas por grupo. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, com marcador estatístico “a”.	75
Figura 8: Concentração de glicemia (mg/dL) durante o teste de tolerância à glicose em camundongos NOD do grupos Diabético, Controle, <i>P.alata</i> e BALB/c.	76

- Figura 9:** Análise estatística da área sob a curva de glicose em camundongos NOD dos grupos Diabético, Controle, *P.alata* e camundongos BALB/c. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,01$. 76
- Figura 10:** Dosagem sérica de insulina pelo método enzimático ELISA em camundongos NOD do grupo controle (n=15), diabético (n=15) e *P.alata* (n=15). Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$. 78
- Figura 11:** Gráfico representativo da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de estresse oxidativo em camundongo NOD controle (n=3), tratado com *P.alata* (n=3) e diabético (n=3). 90 ilhotas por grupo foram analisadas. 80
- Figura 12:** Gráfico representativo da área de correspondente a presença de células positivas marcadas pelo estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas em camundongo NOD controle (n=3), NOD *P.alata* (n=3) e diabético (n=3). 90 ilhotas por grupo foram analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$; a/c: $p < 0,001$; b/c: $p < 0,01$. 80
- Figura 13:** Gráfico representativo da percentagem de células apoptóticas a partir da classificação do grau de insulite no camundongo NOD controle (n=3), NOD *P.alata* não diabético (n=3) controle diabético (n=3). 90 ilhotas pancreáticas por grupo foram analisadas. 83
- Figura 14:** Gráfico representativo da distribuição nas ilhotas pancreáticas de células apoptóticas considerando a relação entre a área e numero de células marcadas na ilhota. NOD controle (n=3), tratado com *P.alata* (n=3) e diabético (n=3). 90 ilhotas por grupo foram analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, com marcador estatístico “a”. 83
- Figura 15.** Gráfico representativo da porcentagem de infiltrado TCD4+ considerando a área da ilhota e a área de células marcadas. NOD controle não diabético (n=3), NOD *P.alata* (n=3) e controle diabético (n=3). 90 ilhotas pancreáticas por grupo foram analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,01$. 84
- Figura 16:** Gráfico representativo da porcentagem de infiltrado LTCD8+ considerando a área da ilhota e a área de células marcadas. NOD controle não diabético (n=3), NOD *P.alata* não diabético (n=3) e controle diabético (n=3). 90 ilhotas pancreáticas por grupo foram analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, com marcador estatístico “a”. 85

- Figura 17:** Gráfico representativo da porcentagem de infiltrado CD11c+ considerando a área da ilhota e a área de células marcadas. NOD controle não diabético (n=3), NOD *P.alata* (n=3) e controle diabético (n=3). 90 ilhotas pancreáticas por grupo foram analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,05. **86**
- Figura 18.** Gráfico representativo dos infiltrados celulares, considerando o grau de insulite. A) Linfócitos TCD4⁺; B) Linfócitos TCD8⁺; C) Macrófagos CD11c⁺. Foram analisados os grupos NOD controle não diabético (n=3), NOD *P.alata* não diabético (n=3) e controle diabético (n=3), 90 ilhotas por grupo foram analisadas. **87**
- Figura 19:** Gráfico representativo da imunofenotipificação de células insulino+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *P.alata* não diabético. n=3, 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,001; b/c: p<0,001; a/c: p<0,05. **90**
- Figura 20:** Gráfico representativo da imunofenotipificação de células glucagon+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *P.alata* não diabético. n=9, 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,001. **91**
- Figura 21:** Gráfico representativo da imunofenotipificação de células somatostatina+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e NOD *P.alata* não diabético. n=9, 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,05; a/c: p<0,001. **92**
- Figura 22:** Gráfico representativo da imunofenotipificação de células GLP-1+/área nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e NOD *P.alata* não diabético. n=9, 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,01. **93**
- Figura 23:** Gráfico representativo da imunofenotipificação de células CDK-6+/área das ilhotas, Controle não diabético, Diabético e NOD *P.alata* não diabético. n=9. 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,001. **101**
- Figura 24:** Gráfico representativo da expressão gênica por PCR-Tempo Real de ilhotas isoladas dos grupos controle; diabético e NOD *P.alata* não diabético. A) Insulina (a/b: p<0,01); B) GLP-1 (a/b: **105**

p<0,05); C) Neuro-D (a/b: p<0,05); D) NGN3 (marcador estatístico “a”); E) PDX-1 (marcador estatístico “a”). Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

Figura 25: Gráfico representativo da expressão gênica de ilhotas isoladas dos grupos controle; diabético e NOD *P.alata* não diabético. A) CDK1; B) CDK2; C) CDK4; D) CDK6. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, com marcador estatístico “a”.

107

Figura 26: Ensaio de linfoproliferação de linfócitos T esplênicos na presença de extrato aquoso de *P. alata*; A) – Histogramas representando a porcentagem de células em proliferação (CSFE_{low}) nos grupos: Controle – (ausência de ConA), Controle + (2,5µg/mL ConA) , e adicionado 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL de extrato aquoso de *P.alata* na presença de 2,5µg/mL ConA; B) – As barras representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) da porcentagem de células em proliferação (CSFE_{low}), nos grupos descritos anteriormente; C) - As barras representam a média ± E.P.M. do índice de proliferação, nos grupos descritos anteriormente. A, b, c representam marcadores de diferenças estatísticas. B) a/b; a/c; b/c p<0,0001; C) a/b; a/c p<0.0001; b/c p= 0.0038. Teste t não paramétrico Mann-Whitney.

108

- Prancha I:** Fotomicrografia dos cortes pancreáticos representando a presença de estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD e BALB/c como controle de linhagem não relacionada. (n=9). 90 ilhotas por grupo analisadas. NODs A) controle; B) diabético; C) *P.alata*; D) BALB/c. Setas indicam marcação do estresse oxidativo. Ampliação 200 e 400 vezes, barra 10µm. **79**
- Prancha II:** Fotomicrografia dos cortes pancreáticos representando a presença das células apoptóticas nas ilhotas pancreáticas nos camundongos NOD e BALB/c (controle de linhagem não relacionada). N=9. 90 ilhotas por grupo analisadas. A) Controle não diabético; B) Diabético; C) NOD *P.alata* não diabético; D) BALB/c corte controle. Setas indicam marcação de apoptose. Ampliação 200 e 400 vezes, barra 10µm. **82**
- Prancha III:** Fotomicrografia representativa do infiltrado de linfócitos TCD4+ em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). NODs A) controle; B) diabético; C) *P.alata*; D) Controle negativo do procedimento. Setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm. **84**
- Prancha IV:** Fotomicrografia representativa do infiltrado de linfócitos TCD8+ em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). NODs A) controle; B) diabético; C) *P.alata*; D) Controle negativo do procedimento. Setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm. **85**
- Prancha V:** Fotomicrografia representativa do infiltrado de células CD11+ em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). NODs A) controle; B) diabético; C) *P.alata*; D) Controle negativo do procedimento. Setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm. **86**
- Prancha VI:** Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células insulina+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animaml por grupo). As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm. **90**
- Prancha VII:** Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células glucagon+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal **91**

por grupo). As setas apontam para a imunomarcação. Aumento de 200x. Barra=10µm.

Prancha VIII: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células somatostatina+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a imunomarcação. Aumento de 200x. Barra=10µm. **92**

Prancha IX: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células GLP-1+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a imunomarcação. Aumento de 200x. Barra=10µm. **93**

Prancha X: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de Pdx1 em 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo) de camundongos NOD (n=9). NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. As setas apontam para a imunomarcação. Aumento de 200x. Barra=10µm. **94**

Prancha XI: Fotomicrografias representativas de imunofetopificação de NGN3 em 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo) de camundongos NOD (n=9). NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. As setas apontam para a imunomarcação. Aumento de 200x. Barra=10µm. **94**

Prancha XII: Fotomicrografias representativas da imunofenotipificação de células CDK1+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a CDK1+ (1) e infiltrado celular (2) e a delimitação corresponde à área de células CDK1+ coincidente com o infiltrado celular. Aumento de 200x. Barra=10µm. **97**

Prancha XIII: Fotomicrografias representativas da imunofenotipificação de células CDK2+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a CDK2+ (1) e infiltrado celular (2) e a delimitação corresponde à área de células CDK2+ coincidente com o infiltrado celular. Aumento de 200x. Barra=10µm. **98**

Prancha XIV: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células CDK4+ nas ilhotas, NODs A) controle **99**

(n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a CDK4+ (1) e infiltrado celular (2) e a delimitação corresponde à área de células CDK4+ coincidente com o infiltrado celular. Aumento de 200x. Barra=10µm.

Prancha XV: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células CDK6+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a CDK6 (1) e infiltrado celular (2) e a delimitação corresponde à área de células CDK6+ coincidente com o infiltrado celular. Aumento de 200x. Barra=10µm. **100**

Prancha XVI: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células CDK6+ nas ilhotas pancreáticas acompanhando a insulite em ilhotas de camundongos NOD. As imagens de A a F correspondem às ilhotas em diferentes graus de infiltrado celular e imunomarcção de células CDK-6+. As setas correspondem as imunomarcações de CDK6+(1) e insulite (2) nas ilhotas e as delimitações demonstram a similaridade de localização de células CDK-6+ e infiltrado celular. **102**

Prancha XVII: Fotomicrografia representando dupla marcação de linfócitos TCD8⁺ e CDK6+ em ilhota pancreática de camundongos NOD. As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x - Barra=10µm; Aumento de 400x – Barra=10µm. A) TCD8 – Texas Red; B) CDK6 – FITC; C) DAPI; D) Sobreposição de imagens– 200x; E) Sobreposição de imagens – 400X. **103**

Prancha XVIII: Fotomicrografia representando dupla marcação de células insulino+ e CDK6+ em ilhota pancreática de camundongos NOD. As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x - Barra=10µm; Aumento de 400x – Barra=10µm. A) Insulina – Texas Red; B) CDK6 – FITC; C) DAPI; D) Sobreposição de imagens – 200x; E) Sobreposição de imagens – 400X. **104**

Tabela 1: Primers empregados no procedimento de PCR em Tempo Real.	64
---	-----------



RESUMO

A procura por novos fármacos a partir de plantas medicinais tem motivado a busca alternativa de substâncias com potencial antiinflamatório que possam auxiliar no tratamento das doenças inflamatórias, como no caso do diabetes mellitus tipo 1. Como ferramenta para estudar essas substâncias que modulam a inflamação, é comum o uso de animais com propensão a desenvolver a doença, como os camundongos NOD (diabéticos não obesos). Dentre os constituintes das folhas de *Passiflora alata* Curtis, conhecido popularmente por maracujá doce, os flavonóides são compostos que podem atuar como antioxidantes e antiproliferativos, podendo modular a expressão de substâncias reguladoras do ciclo celular promovendo, desta forma, a sua interrupção em células em proliferação. Como resultados, nós obtivemos no grupo tratado com extrato aquoso das folhas de *P. alata*, redução na incidência do diabetes, aumento da expressão de insulina e diminuição do infiltrado inflamatório, estresse oxidativo e células CDK6+ em ilhotas pancreáticas. Como neste modelo animal a expressão de CDK6 está presente no infiltrado inflamatório, a sua diminuição no grupo tratado sugere que componentes nas folhas de *P. alata* possam atuar na inibição do ciclo celular de células inflamatórias ativadas promovendo efeito antiinflamatório e, conseqüentemente, diminuição na incidência do diabetes tipo 1. Visto os efeitos antiinflamatórios e conseqüente preservação de células beta, o estudo visa investir no desenvolvimento de novas drogas com potencial de interferir na evolução da doença, atuando desta forma como suporte no tratamento do diabetes autoimune.

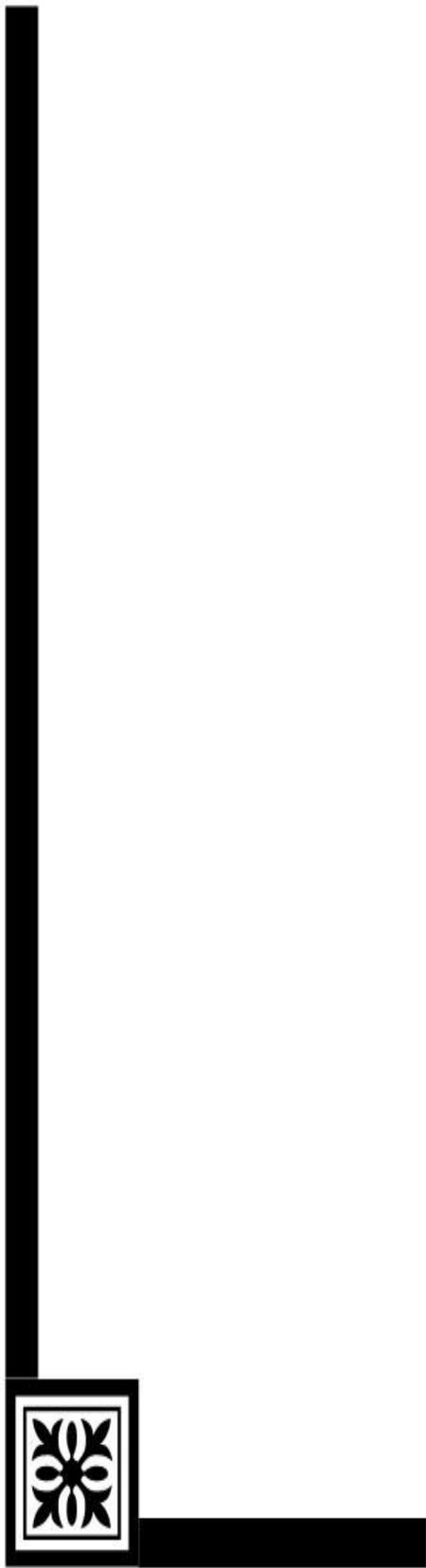
Termos de Indexação: *Passiflora alata*; camundongos NOD, diabetes mellitus tipo 1; ciclo celular.



ABSTRACT

The search for new medicinal drugs from plants has motivated the search for alternative potential anti-inflammatory substances that may assist in the treatment of inflammatory diseases, such as type 1 diabetes mellitus. As a tool to study these substances that modulate inflammation, is common to use animals with a propensity to develop the disease, such as NOD mice (non-obese diabetic). Among the constituents of *Passiflora alata* Curtis leaves, known popularly as sweet passion fruit, flavonoids are compounds that can act as antioxidants and anti-proliferative, which can modulate the expression of cell cycle regulatory substances promoting in this way, the cell cycle arrest in proliferating cells. As a result, we have obtained in the treated group with *P. alata* leaves aqueous extract, reduction in the incidence of diabetes, increased expression of insulin and decreased inflammatory infiltrate, oxidative stress and CDK6+ cells in pancreatic islets. As in this animal model the marking of CDK6 is present in the inflammatory infiltrate, the decreased expression of this protein in the treated group suggests that components in the leaves of *P. alata* may act on cell cycle inhibition of activated inflammatory cells promoting anti-inflammatory effect and reduction in the incidence of type 1 diabetes. Since the anti-inflammatory effects and consequent preservation of beta cells, the study intend to investing in the development of new drugs with the potential to interfere with the course of the disease, acting as a support in the treatment of autoimmune diabetes.

Index Terms: *Passiflora alata*; NOD mice; type 1 diabetes mellitus; cell cycle.



1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus (DM) é definido como desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, resultando na deficiência da secreção e/ou ação da insulina (1). Essa doença é classificada em 4 tipos: a) Diabetes mellitus tipo 1 (DM-1); b) Diabetes mellitus tipo 2 (DM-2); c) Outros tipos específicos de diabetes, incluindo diabetes secundário ou associado a outras doenças; d) Diabetes mellitus gestacional (1).

O diabetes mellitus tipo 1 autoimune (DM-1), com estimativa populacional de 5 a 10% dos casos de diabetes, é distúrbio endócrino no qual o metabolismo de glicose se altera devido a deficiência de insulina após destruição das células β pancreáticas responsáveis pela sua produção e liberação (2).

No DM-1, as células apresentadoras de antígenos (APCs) expressam moléculas de MHC classe II/I e coestimulantes que ativam clones específicos de $CD4^+$ e $CD8^+$. A ativação de células T e macrófagos infiltrantes nas ilhotas libera citocinas pró-inflamatórias, como $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, que participam no processo de destruição de células β pancreáticas e consequente manifestação do diabetes tipo 1 (3-4).

Além dos mecanismos de destruição das ilhotas pancreáticas, os linfócitos $TC8^+$ exercem função citotóxica através da liberação de grânulos de perforinas e granzimas e indução de apoptose através da interação Fas/Fas-L. Linfócitos T $CD8^+$ parecem estar também presentes na fase efetora final da patogênese do diabetes, independente da presença de linfócitos T $CD4^+$. Desta maneira, os linfócitos T auto-reativos e a ineficiência de sua eliminação podem desempenhar papel fundamental no aparecimento do diabetes no modelo de diabetes tipo 1, camundongos NOD (5-6).

1.2. Camundongos NOD (*Non-obese Diabetic*)

A linhagem de camundongos NOD, descrita por Makino, *et al*, (1980), representa o modelo experimental que desenvolve espontaneamente diabetes mellitus autoimune com similaridade ao observado em humanos (7). Essa linhagem de camundongos foi inicialmente desenvolvida no Japão e, no Brasil, foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas por Pavin & Zollner (1994) a partir de colônias matrizes provenientes do laboratório INSERM U-25-Necker, Paris, França (8).

A colônia NOD estabelecida e mantida no Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), em condições livres de patógenos (SPF), apresenta prevalência de diabetes entre 60-90% nas fêmeas e 5-20% nos machos. Fatores ambientais como dieta e exposição à patógenos têm sido considerados como causas das diferenças de incidência (8).

Nesse modelo animal, o diabetes ocorre entre a 12^a e 24^a semana de vida, mais frequentemente nas fêmeas (7). Estudos histológicos mostraram que, aproximadamente na 4^a semana de vida, são observadas poucas células imunes infiltradas nas ilhotas e presença de infiltrados mononucleares ao seu redor (peri-insulite). Estes infiltrados de células mononucleares progridem e invadem as ilhotas pancreáticas (insulite) (9). Nesta fase, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são predominantemente observados, embora células NK, linfócitos B, células dendríticas e macrófagos também possam ser encontrados (10).

1.3. *Passiflora alata* Curtis

Nos últimos anos, o interesse na dieta com a finalidade de prevenção de diversas doenças, tais como o diabetes, vem aumentando na população mundial. A adesão da população à utilização de produtos naturais está muitas vezes relacionada à insatisfação e

ao custo da medicina convencional (11). Devido a esse fator, a procura por novas alternativas como fonte de tratamento tem se intensificado.

Têm-se atribuído aos alimentos, além das vantagens nutricionais, um reconhecimento relacionado à resposta fisiológica específica produzida por alguns deles, caracterizando-os como alimentos funcionais. Estes alimentos podem prevenir, curar ou auxiliar na recuperação de determinadas doenças. Neste sentido, a busca pela identificação de substâncias nutracêuticas com efeitos benéficos tem impulsionado as pesquisas na área da saúde e nutrição (12).

O gênero *Passiflora*, conhecido popularmente como maracujá, possui aproximadamente 500 espécies no mundo, sendo que o Brasil possui um grande número de espécies endêmicas (13). Espécies de *Passiflora* são populares não apenas devido às suas frutas, mas também ao chá que pode ser usado como sedativo, diurético, tônico e também no tratamento de hipertensão e doenças de pele (14).

A casca do maracujá é composta pelo flavedo, que corresponde à parte externa, rico em fibras insolúveis, e pelo albedo, que corresponde à parte interna, rico em fibras solúveis (11). Não há muita informação em relação à composição de suas folhas, apenas citações de sua ação como diurética, no tratamento da hipertensão e menopausa (11, 15).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero, *Passiflora alata* Curtis, maracujá doce, se destaca por ser reconhecido pela Farmacopéia Brasileira (1977) e por estar entre as espécies de maior interesse comercial no país (16).

Na composição química das folhas de *P.alata* (figura 1, pág. 39) são encontradas substâncias fitoquímicas com ação antioxidante como os polifenóis destacando-se, dentre eles, os ácidos fenólicos e os flavonóides, além dos compostos alcalóides (17-19). Dentre os flavonóides, já foram identificados alguns compostos polifenólicos, dentre eles, vitexina,

isovitexina, orientina, isoorientina e apigenina (15, 20-21). Estes compostos têm sido muito estudados por apresentarem propriedades antialérgica, antiinflamatória, antimicrobiana e anticancerígena (22-23).

Alguns flavonóides apresentam ações bioquímicas e farmacológicas que afetam a atividade de células imune como linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos e mastócitos (24). A sinalização celular é importante para as células executarem suas funções e alguns flavonóides, como a quercetina, têm modulado a produção de citocinas pró-inflamatórias através da supressão da atividade de componentes da sinalização como NF-kB, ERK, p38, MAPK em macrófagos, diminuição da produção de interleucina-6 (IL-6) e, além disso, outros flavonóides mostraram-se eficientes no tratamento de artrite reumatóide induzida por cristais (25-27).

A maior parte dos estudos sobre os efeitos dos flavonóides estão vinculados ao câncer, empregando modelos experimentais ou clínicos. Estes compostos têm mostrado efeitos na inibição do ciclo celular e seu potencial efeito para seu desenvolvimento como agente anticancerígeno, tais como epicatequina galato (28), epigallocatequina galato (29), naringina (30-31), rutina (32), luteolina (33-35), malvidina (36) e apigenina (37-38), o que torna interessante os estudos das propriedades antiinflamatórias de substâncias ricas em flavonóides.



Figura 1. Folha de *Passiflora alata* Curtis proveniente do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

1.4. Proteínas reguladoras do ciclo celular

O ciclo celular é dirigido por uma família de proteínas denominada quinase dependente de ciclina (CDK) (39). A regulação dessas quinases é realizada de forma positiva pelas ciclinas e de forma negativa pelos inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKis) (40). A associação das CDKs com as ciclinas forma complexos denominados Ciclina/CDK, que são ativados e promovem fosforilação de sítios específicos do CDK, resultando no funcionamento normal do ciclo celular (41). Já os CDKis propiciam a inibição de sítios específicos de CDK e, como consequência, o ciclo celular é interrompido.

Estudos com flavonóides naturais mostram sua propriedade de inibição de algumas CDKs (42-43), incluindo CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6, que estão envolvidas na regulação do ciclo celular de mamíferos quando ligadas as ciclinas correspondentes, resultando no complexo Ciclina/CDK (44-45).

Quanto ao ciclo celular, a progressão de G1 e transição das fases G1/S são reguladas pelas CDKs 4 e 6, que formam complexos com a Ciclina D. A proteína retinoblastoma (Rb) é fosforilada e o fator E2F é liberado, o que resulta na ativação e transcrição de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular (40, 45). A CDK2 é ativada e se liga a ciclina E e A para completar a fosforilação da proteína Rb e de proteínas envolvidas no ciclo celular, permitindo a replicação do DNA e facilitando a transição das fases G1/S do ciclo celular (40). A CDK1, junto às ciclinas A e B, regulam a transição da fase G2/M (40, 42). O complexo CDK1/CiclinaB promove a transição da fase G2-M no ciclo celular e é importante na mitose por facilitar a transição para a anáfase (46-47), enquanto CDK1 associado a Ciclina A promove a transição da fase S-G2 (45) (figura 2A, pág. 41).

Os CDKis podem atuar na inibição de eventos de proliferação de células inflamatórias e serem utilizados como ferramenta útil nos estudos de doenças relacionadas a este tipo de evento (48).

Estes inibidores são divididos em duas famílias denominadas CIP/KIP e INK4. A família CIP/KIP inclui as proteínas p21, p27 e p57, enquanto a família INK4 consiste nas proteínas p15, p16, p18 e p19 (49). Na regulação do ciclo celular, as proteínas da família CIP/KIP podem interagir com os complexos CDK4/CiclinaD, CDK6/CiclinaD, CDK2/CiclinaE, CDK2/CiclinaA, CDK1/CiclinaA e CDK1/CiclinaB enquanto as proteínas da família INK4 inibem apenas os complexos CDK4/CiclinaD e CDK6/CiclinaD, bloqueando a progressão do ciclo celular e consequente proliferação celular (figura 2B, pág. 41) (50). Alguns estudos mostram a existência da propriedade antiproliferativa dos flavonóides que interferem na modulação destas proteínas reguladoras, promovendo a diminuição de expressão e consequente interrupção do ciclo celular (30-31, 41, 51-53).

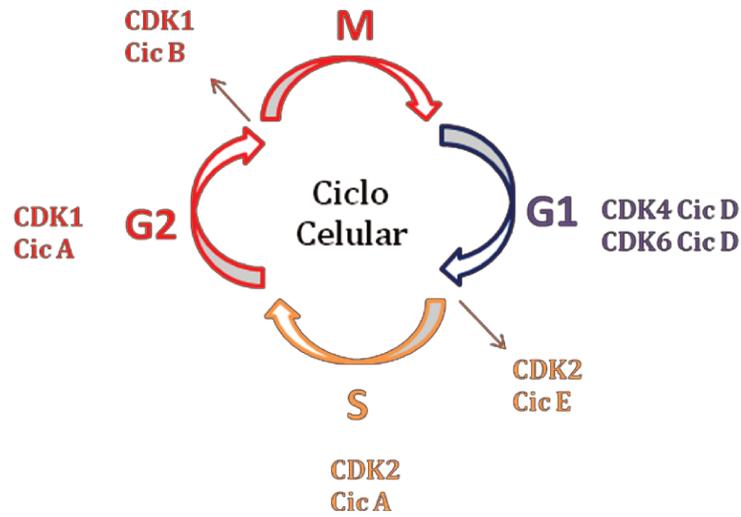


Figura 2A. Complexos Ciclina/CDK e sua atuação em diferentes fases do ciclo celular de mamíferos.

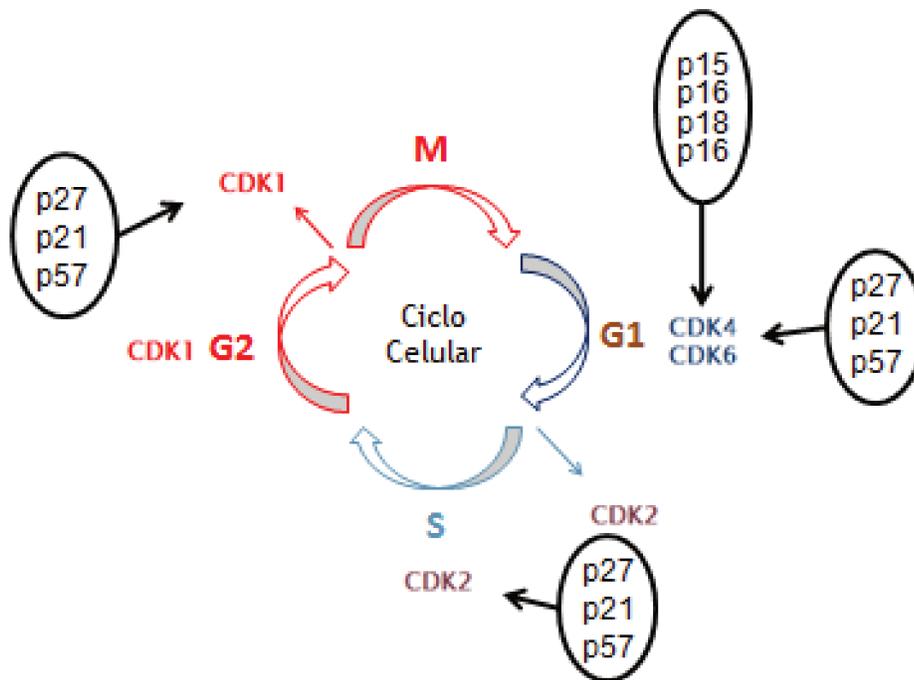


Figura 2B. Ciclo celular. Interação dos inibidores das famílias CIP/KIP (p21, p27 e p57) e INK4 (p15, p16, p18 e p19) com as CDKs correspondentes.

Ilhotas pancreáticas de murinos expressam pRB, p107, p130, ciclinas D1, D2, D3, A e E, CDKs 2 e 4 e inibidores de CDKs p15, p16, p18, p19, p21, p27, p57 (54-56). A ciclina D2, que forma complexos com CDK4 e CDK6, é a mais abundante em murinos (56). Contudo, não há relatos da expressão de CDK6 em ilhotas pancreáticas de camundongos, apenas de CDK4 e CDK2 (54, 57-58)

Em ilhotas humanas são encontradas as ciclinas D1, D2, D3, E, A, CDKs 1, 2, 4 e 6 (57, 59-60). A expressão de ciclinas D1, D2, D3 e das CDKs 4 e 6 aumenta a replicação de células beta em pâncreas de humanos, embora a expressão das ciclinas D2 em ilhotas humanas seja difícil de ser detectada e com menor expressão quando comparada as ilhotas de murinos. Em camundongos, a expressão da ciclina D2 contribui para o crescimento de células beta ao passo que sua inibição causa o diabetes (61-62).

As CDKs 4 e 6 têm papel importante na diferenciação, adesão e recrutamento de células inflamatórias, assim como produção de citocina inflamatória (42, 45, 63). Estudo realizado por Liu, *et al* (2008) mostra que inibidores de CDKs bloqueiam a adesão e a migração de leucócitos *in vitro* e o *knockout* na atividade do CDK4 bloqueia o recrutamento de linfócitos para a lesão pulmonar *in vivo* (63).

Após a ativação de linfócitos T, as proteínas CDK6 e Ciclina D2 são as primeiras moléculas do ciclo celular a serem reguladas positivamente (64), fazendo com que estas células sejam ferramentas interessantes em estudos que envolvam a modulação da atividade de CDK6. Em humanos, o complexo CDK6/CiclinaD1 estimula a replicação de células β *in vitro* e *in vivo* (57).

A expressão de CDKs, tais como p21 e p27, devido a ação de flavonóides pode inibir efeitos proliferativos ocasionando a interrupção do ciclo celular de células em proliferação celular (51, 65-67). A expressão de p21, inibidor de CDK pertencente à família

CIP/KIP, modificaria a ativação e proliferação de linfócitos T e inibiria a expressão de citocinas, especialmente citocinas pró-inflamatórias, o que poderia prevenir a inflamação (48) e, em macrófagos, a proteína p21 é um inibidor de síntese da citocina IL-1 β (68). Yang, *et al* (2009) verificaram que a expressão de p21 em células β produtoras de insulina poderia colaborar com a recuperação de camundongos diabéticos induzidos por streptozotocina (69).

A proteína p27 inibe os complexos CDK2/CiclinaE, CDK2/CiclinaA, CDK4/CiclinaD e CDK6/CiclinaD, agindo na interrupção do ciclo celular (70). Seus efeitos antiproliferativos podem atuar em eventos de proliferação celular (71).

Os inibidores do ciclo celular p21 e p27 estão envolvidos em mecanismos do sistema imune e podem agir no controle de tolerância de linfócitos T, podendo atuar na supressão de doenças autoimune (72).

Tendo em vista os possíveis efeitos dos flavonóides na proliferação celular, a investigação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, tais como as CDKs, poderá trazer informações úteis na investigação dos possíveis efeitos antiinflamatórios dos compostos presentes nas folhas de *P. alata*, servindo como suporte no tratamento de doenças inflamatórias como o diabetes.



2. HIPÓTESE

O Extrato aquoso das folhas de Passiflora alata interfere na expressão das CDKs e no processo inflamatório na ilhota pancreática, favorecendo o processo de regeneração das células β pancreáticas e, conseqüentemente, reduzindo a expressão do diabetes no modelo experimental de diabetes tipo1 (camundongos NOD).



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar as propriedades antiinflamatórias sobre a expressão do diabetes mellitus tipo 1 em camundongos NOD (diabético não obeso) tratados com extrato aquoso das folhas do maracujá *Passiflora alata*.

3.2. Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a frequência cumulativa do DM-1 nos animais tratados em comparação com o grupo controle não tratado.
- 2) Classificar, caracterizar e fenotipificar o infiltrado inflamatório na ilhota pancreática.
- 3) Analisar a expressão das CDKs em ilhotas pancreáticas de animais tratados e sua relação com o processo antiinflamatório.



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Folhas do *Passiflora alata* Curtis

As folhas de *P.alata* eram obtidas por meio da engenheira agrônoma Laura Maria Molina Meletti, curadora do Jardim Botânico do Instituto Agronômico de Campinas. As folhas eram secas em estufa com circulação de ar (Marconi, Piracicaba/SP) sob 50°C/24h e então as mesmas eram moídas até obtenção de um pó homogêneo e estocadas em frasco âmbar sob refrigeração (8°C).

4.2. Extrato aquoso das folhas de *P. alata*

O extrato aquoso das folhas de *P. alata* era feito de acordo com trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (73). Era colocado 1g de folha de passiflora/100mL de água filtrada para processo de extração de compostos fenólicos em autoclave, 120°C por 20 minutos, seguidos por 15 minutos para resfriamento. O extrato era filtrado em capela de fluxo laminar em condições estéreis. A concentração era estabelecida pela determinação EC50 por meio do método DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl) (74-75). A cada nova coleta de folhas, a técnica de DPPH era realizada para determinação da concentração a ser utilizada.

4.3. Desenho Experimental

O grupo experimental era composto por 115 camundongos, sendo:

1) 72 camundongos NOD fêmeas a partir de 4 semanas, divididos em:

- Grupo Extrato Aquoso (NOD *P.alata*): 42 camundongos NOD tratados com ração industrial (Labina - Purina®) + extrato aquoso da folha do maracujá *Passiflora alata* CURTIS (15g folha/litro de água - padrão estabelecido pelo EC₅₀) *ad libitum*.

- Grupo Controle: 30 camundongos NOD tratados com ração industrial (Labina –Purina®) + água *ad libitum*.

Todos os animais eram tratados a partir da 4ª semana até a 28ª semana de vida. Glicemia e peso corpóreo foram monitorados semanalmente. O consumo de água e do extrato aquoso era controlado a cada dois dias, quando era efetuada a troca dos mesmos.

2) 38 camundongos 15-28 semanas de vida para teste de tolerância à glicose, sendo:

- 10 camundongos NOD *P. alata* não diabéticos
- 10 camundongos NOD controle não diabéticos
- 8 camundongos NOD diabéticos
- 10 camundongos BALB/c

3) 5 camundongos NOD fêmeas de 6 semanas para avaliação de linfoproliferação.

4.4. Controle biológico do extrato aquoso de *P.alata*

O controle biológico do extrato aquoso de *P.alata* era realizado por meio da contagem bacteriana em meio de cultura Sabouraud (Difco – Bencton, Dickinson and Co, Sparks, MD EUA).

4.5. Diagnóstico do diabetes e sacrifício dos animais

A ocorrência do diabetes mellitus era monitorada em todos os animais a partir da 10ª semana de vida, através de Medisense Optium® (Abbott Diabetes Care Inc. Alameda, EUA) retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal. A ocorrência do diabetes mellitus era definida por meio da glicemia ≥ 250 mg/dL, de dois dias consecutivos. Os animais

diabéticos e/ou aqueles que completaram 28 semanas, eram sacrificados por meio de punção cardíaca sob anestesia e sedação com cloridrato de Ketamina (Vetbrands, Paulinia, SP; 100-200 mg/Kg) e cloridrato de Xilasina (Vetbrands; 5-16mg/Kg), após jejum de 8 horas. O sangue coletado era transferido para um tubo plástico de 1,5mL, centrifugado para coleta do soro, o qual era armazenado a -80°C para análise posterior de insulina. Os pâncreas eram retirados para análise histológica, imunofenotipificação celular e extração de ilhotas para expressão gênica.

4.6. Avaliação histológica das ilhotas pancreáticas

A avaliação histológica do pâncreas era realizada para análise da morfologia das ilhotas pancreáticas e de seu eventual grau de insulite. Coletava-se série de 15 cortes consecutivos, com 5µm de espessura, depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane, Sigma) seguindo protocolo utilizado por Signori, *et al* (1989) (76) com adaptações feitas em nosso laboratório (77). Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas era debastado 150µm e a seguir outra série de 15 cortes era realizada. As lâminas nº: 1, 15, 16, 30, 31 e 45 eram coradas pela técnica Hematoxilina/Eosina e observadas em microscópio óptico e as lâminas subsequentes eram utilizadas para técnica de imunofluorescência indireta.

Para análise histológica do pâncreas, as ilhotas eram divididas segundo o grau de infiltrado celular. Grau 0 era constatado quando a ilhota não apresentava infiltrado celular. Ilhotas de grau 1 apresentavam infiltrado inferior a 25%. Quando a ilhota possuía infiltrado entre 25 e 80% de sua área, ela era classificada como de grau 2. O grau 3 apresentava ilhotas com infiltrado superior a 80% e inferior a 100%, enquanto ilhotas com sua área completamente tomada pelo infiltrado celular era classificadas como ilhotas de grau 4.

O índice de insulite era calculado seguindo a fórmula (78):

$$I = \frac{(0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4)}{4 \times (N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4)}$$

Onde:

I: corresponde ao Índice de insulite;

Números 0, 1, 2, 3 e 4: aos graus de insulite;

N: corresponde ao número de animais com os respectivos graus de insulite.

4.7. Teste de tolerância à glicose

O procedimento seguia o protocolo estabelecido por Andrikopoulos, *et al*, (2008) (79). Os animais ficaram em jejum durante 4 horas e após o jejum era realizada a glicemia dos camundongos no tempo 0, retirando-se amostra de sangue da veia caudal e dosada através de Medisense Optium[®] (Abbott Diabetes Care Inc. Alameda, EUA).

Logo após a dosagem no tempo 0, procedia-se a administração via intraperitoneal de glicose 25% (1g/1Kg/peso), e leitura das demais glicemias nos tempos 10, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose.

4.8. Detecção dos níveis de Insulina Sérica

A análise de insulina sérica seguiu o protocolo do ELISA Kit rat/mouse Insulin descrito pelo fabricante (Millipore[®], Bellirica, EUA). Após jejum de 4 horas, os camundongos eram sacrificados. O soro dos animais era colocado na placa junto com a curva na concentração de 0,2-10 ng/μL e os dois controles Q1 e Q2 provenientes do kit.

Sua leitura era feita nos comprimentos de onda 450nm e 590nm em espectrofotômetro (Spectramax, 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA) e sua curva lida em 4 parâmetros.

4.9. Estresse oxidativo

Para a análise do estresse oxidativo era utilizado o Kit OxyIHC-Oxidative Stress Detection (Millipore, Billirica, USA) com algumas modificações. As lâminas de cada animal eram fixadas em methacarn (30mL metanol + 15mL clorofórmio+ 5mL ácido acético glacial) por 15 minutos. O bloqueio era feito com água oxigenada 3% por 10 minutos. Os processos seguintes seguiam os passos estabelecidos pelo fabricante. As lâminas eram montadas com meio Entellan (Merk® KGaA, Darmstadt, Alemanha) para observação no microscópio óptico (Nikon eclipse 80i, Japão) e as imagens capturadas eram processadas em Tempo Real pelo programa computacional NIS-ELEMENTS AR®, (Nikon). Para a quantificação das células marcadas nas ilhotas era empregado o programa computacional de uso livre ImageJ®/Fiji versão 1.64 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

4.10. Detecção de Células Apoptóticas (Túnel)

As análises de apoptose eram feitas pelo Kit *In situ cell death detection*, POD. (Roche, Mainhein, Alemanha) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. As lâminas eram montadas com meio Entellan (Merk®) para observação no microscópio óptico Eclipse 80i® (Nikon)

4.11. Imunofenotipificação celular

Para a fenotipificação do infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas era realizada microscopia de imunofluorescência, empregando anticorpos primários para linfócitos CD4⁺ (na concentração 1:100), CD8⁺ (1:200) e CD11c⁺ (1:200) (todos Ebioscience, San Diego, CA, EUA). Os anticorpos primários anti-insulina (1:100), anti-somatostatina (1:100), anti-glucagon (1:150), anti-GLP-1 (1:100), anti-Ngn-3 (1:100), anti-PDX-1 (1:100), anti-CDC2 (1:100), anti-CDK2 (1:100), anti-CDK4 (1:100), anti-CDK6 (1:150) (todos Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos secundários conjugados com fluorocromo empregados: fluoresceína isotiocianato (FITC) e texas red (TR): goat anti-rat (1:500) para CD4 e goat anti-hamster (1:500) para CD11c, além do anticorpo secundário dunkey anti-goat (1:400) para GLP-1 e Ngn-3, goat anti-rat (1:500) para CD8 (todos Santa Cruz) e goat anti-rabbit (1:1000) para glucagon, somatostatina, insulina, PDX-1 e CDKs 1, 2 4 e 6 (todos Vector Laboratories - Burlingame, CA, EUA). Para os bloqueios eram utilizados isotipos da espécie de onde proveio o anticorpo secundário (Vector). O microscópio Eclipse 80i® (Nikon) era empregado para análise, e as imagens capturadas e processadas em Tempo Real pelo programa computacional NIS-ELEMENTS AR®, (Nikon). Para a quantificação das células marcadas nas ilhotas era empregado o programa computacional de uso livre ImageJ®/Fiji versão 1.64 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

As lâminas selecionadas eram colocadas na acetona por 15 minutos. Eram realizadas 3 lavagens em PBS 0,1X por 5 minutos. As lâminas eram mantidas em solução bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente. Eram realizadas mais 3 lavagens em PBS 0,1X por 10 minutos e as lâminas eram incubadas com anticorpo primário a 8°C, overnight. No dia seguinte, eram realizadas mais 3 lavagens por 10 minutos cada em PBS 0,1X e as lâminas eram incubadas com o anticorpo secundário por 2 horas em temperatura ambiente.

Passadas as 2 horas, eram realizadas mais 3 lavagens e era colocado DAPI (Thermo Scientific, South Logan UT, EUA) para marcação nuclear por 5 minutos na concentração 1:15000, diluído em água milliQ. As lâminas eram montadas com meio de montagem (Dabco - 0,5g , Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); Glicerol - 18mL (Sigma), PBS 0,15M - 1,2mL e mantidas a 8°C. O procedimento de Dupla marcação era realizado com os mesmos anticorpos empregados para marcação simples TCD8 e CDK6. O equipamento de microscopia empregado para análise de resultados obtidos foi da Eclipse 80i® e as imagens eram capturadas e processadas em Tempo Real pelo programa computacional NIS-ELEMENTS AR®. Para a quantificação das células marcadas nas ilhotas era empregado o programa computacional de uso livre ImageJ®/Fiji versão 1.64 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

4.12. Extração de ilhotas pancreáticas

A extração de ilhotas era realizada seguindo o protocolo estabelecido por Gotoh, *et al*, (1985) (80) e Szot, *et al*, (2007) (81) com modificações feitas pelo nosso laboratório. Era injetado no ducto pancreático dos pâncreas dos animais selecionados para esta técnica 3 mL de Colagenase tipo V (Sigma) na concentração 2,5mg/mL em solução de Hanks preparada em nosso laboratório contendo 2,8 mM de glicose até intumescimento do pâncreas para digestão enzimática por 13-15 minutos a 37°C. Eram realizadas 3 lavagens com centrifugação por 13 segundos em solução de Hanks e, após a última lavagem e remoção total do sobrenadante, era utilizado Percoll (GE Healthcare – Pittsburgh - PA-EUA) nas densidades 1.108, 1.096, 1.069 e 1.064 para separação das ilhotas. As fases 1.096 e 1.069 eram coletadas e transferidas para outro tubo para que fosse feitas mais 3 lavagens de 13 segundos com solução de Hanks. Após descartar o sobrenadante, as ilhotas eram

suspensas em 10mL de solução de Hanks e adicionada solução de Ditzona/DMSO (10mg/mL - Sigma) na concentração 1:10, e as ilhotas eram mantidas a 37°C por 15 minutos confirmação e teste de viabilidade. Após identificação, microscopia óptica em aumento de 100x, as ilhotas eram coletadas por aspiração, com auxílio de pipeta e ponteira livre de RNase e com barreira. As ilhotas eram mantidas em TRizol® (Invitrogen LifeSciences, Grand Island, N.Y., EUA) a - 80°C.

4.13. Extração de TRNA e Síntese de cDNA

O TRNA era extraído de acordo com a bula de TRIZOL (Invitrogen) para extração de RNA. As amostras de RNA eram submetidas ao RNA Clean and Concentrator™ -5 Kit (Zymo Research, CA, EUA) e eram estimadas por intermédio de leitura em espectrofotômetro Picodrop 2.0 (Picodrop Ltd, Saffron Walden, Reino Unido) e sua integridade verificada por corrida em eletroforese em gel de formaldeído. O RNA era considerado de boa qualidade com a relação das leituras 260/280 entre 1.8 e 2.0. O RNA era mantido em biofreezer (-80°C). Após o procedimento de extração, era realizada a síntese de cDNA (Fermentas, Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA) e as amostras mantidas em freezer à -20°C.

4.14. Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real

As curvas de eficiência gênica (1:2) partiam do gradiente de concentração de 200 a 6,25ng de amostra (anexo, pág. 143). A concentração de primers utilizados era 300nM (tabela 1, pág. 64) Ciclofilina e NGN3 (Exxtend, SP, Brasil) e Insulina, Neuro-D, GLP-1, PDX-1, CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6 (Bioneer Co, Coreia). Após estudo e padronização da eficiência gênica com curvas de amplificação de 99 a 101%, as amostras de cDNA das

ilhotas dos camundongos dos grupos *P.alata*, controle e diabético eram submetidas a quantificação relativa do gene alvo juntamente ao endógeno (ciclofilina) para normatização das amostras, utilizando-as na concentração de 100ng. Para quantificação da expressão era utilizada a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (82-83), utilizando-se uma amostra do grupo controle como calibradora.

Tabela 1. Primers empregados no procedimento de PCR em Tempo Real.

Ciclofilina							
Sense	GGT	TCC	TCC	TTT	CAC	AGA	
anti-sense	CCA	TCC	AGC	CAT	TCA	GTC	
NGN3							
Sense	TCC	GAC	CAT	CCA	TCA	CCT	
anti-sense	AAG	ACG	ACG	AAC	ATC	TAT	G
PDX-1							
Sense	ATC	TGC	CTC	TAG	GAC	TCT	
anti-sense	GAT	TTG	GAA	CGC	TCA	AGT	T
GLP-1							
Sense	GAA	CTC	CAA	TAT	GAA	CTA	CTG
anti-sense	ATG	ACA	CGG	ATG	AAG	ATA	A
Insulina							
Sense	AGT	TAT	CTC	TGT	CTT	TGT	CTT
anti-sense	TGC	TAC	GGA	TGG	ACT	GTT	
Neuro-D							
Sense	AGT	TAT	TGC	GTT	GCC	TTA	G
anti-sense	CAT	CCT	CTT	GAG	TGT	TAT	GG
CDK1							
Sense	CGT	CGT	AAC	CTG	TTG	AGT	
anti-sense	CCT	TAT	ACA	CCA	CAC	CGT	AA
CDK2							
Sense	GAG	TGC	TTG	GAA	GTC	AAT	CT
anti-sense	CTA	CAG	CCT	CAG	GAT	GGA	
CDK4							
Sense	TGA	TGG	ATG	TCT	GTG	CTA	
anti-sense	TCC	TGG	TCT	ATA	TGC	TCA	A
CDK6							
Sense	AGG	TGA	CTG	ATA	GTA	AGA	AG
anti-sense	CAA	CTC	TGA	GGA	CTT	AGG	

4.15. Ensaios de proliferação de linfócitos T na presença de extratos aquosos de *P. alata*

Para os ensaios de linfoproliferação de linfócitos na presença do extrato aquoso de *Passiflora alata*, cinco camundongos da linhagem NOD fêmeas de 6 semanas eram sacrificados para obtenção dos baços. Os órgãos eram retirados assepticamente e transferidos para frascos estéreis contendo meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., EUA), acrescido de 20mM HEPES (Gibco), 10U/mL de penicilina (Gibco), 10µg/mL de estreptomicina (Gibco), 5µg/mL de Fungizone (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Hyclone, Thermo Scientific). Em seguida, os baços eram macerados em peneira esterilizada para dissociação dos órgãos e obtenção das suspensões celulares. Após a lavagem com o meio de cultura e centrifugação por 5 minutos à 400g, as células eram ressuspensas em 3mL de tampão Amônio-Cloreto-Potássio (ACK) e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para lise de hemácias. Em seguida as células foram ressuspensas em 10mL de meio de cultura e novamente centrifugadas à 400g por 5 minutos. Por fim, as suspensões celulares obtidas eram enriquecidas na fração de linfócitos T, por meio de protocolo de adesão em colunas de lã de nylon (84).

A análise da proliferação celular dos linfócitos T era avaliada por intermédio de ensaios de citometria de fluxo utilizando a marcação prévia das células com 10µM da sonda fluorescente carboxifluoresceína diacetato, succinimidil éster (CFSE) (Molecular Probes, Invitrogen Corporation, EUA) conforme descrito por Lyons, *et al*, (2013) (85). Posteriormente, os linfócitos T eram semeados em placas de cultura celular, compostas por 96 poços, na concentração final de 2×10^5 células por poço, sendo estimuladas para proliferar com o mitógeno Concanavalina A (ConA) (Sigma) na concentração final de 2,5µg/mL. Aos poços era adicionado o extrato aquoso de *Passiflora alata*, previamente

filtrado em membranas de 0,2µm (Millex®, Millipore, Bilerica, MA, EUA) nas concentrações finais de 5, 10, 20, 50 e 100µg/mL, sendo que as células do grupo controle recebiam apenas meio de cultura. As placas eram incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A aquisição das amostras era realizada em citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Millipore) após 72h, sendo as análises dos dados de citometria feitas no software Flowing Software Versão 2.5.0 (programa computacional livre, Turku Centre for Biotechnology, Finland). Como parâmetros para a análise da proliferação celular, eram utilizados a porcentagem de células em proliferação e o índice de proliferação. A porcentagem de proliferação era calculada como a porcentagem de células cuja intensidade de fluorescência da sonda CFSE (células CFSE^{low}) esteja diminuída quando comparadas com a intensidade de fluorescência das células sem a presença do estímulo (ConA) de proliferação (controle negativo). No caso do índice de proliferação, o calculo era realizado conforme descrito por Blake, *et al*, (2012) (86), conforme expressão abaixo: onde I.P = índice de proliferação; n é o número de células em cada pico divisional; G0, G1, G2, G3, G4 = gerações celulares;

$$I.P. = \frac{nG0 + nG1 + nG2 + nG3 + nG4}{nG0 + nG1 + nG2 + nG3 + nG4}$$

$$nG1/2G1 + nG2/2G2 + nG3/2G3 + nG4/2G4$$

4.16. Análise Estatística

Os resultados eram expressos como média e erro padrão e submetidos à análise por:

- 1) Teste t *Student* para análise de consumo;
- 2) Teste t não paramétrico Mann-Whitney para ensaios de linfoproliferação;
- 3) Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) para o restante das análises.

Nos gráficos, letras iguais localizadas em cima das barras correspondem à ausência de diferença estatística entre os grupos, enquanto letras diferentes correspondem a grupos estatisticamente diferentes. Eram considerados dados estatísticos significativos quando $p < 0,05$, empregando o programa computacional GraphPad versão 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

4.17. Formatação de Texto

A formatação das citações e referências bibliográficas era realizada empregando-se o programa computacional EndNote X3 (Copyright© The Thompson Corporation.EUA) no formato Vancouver, segundo as normas da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp.



5. RESULTADOS

Definição dos grupos e nomenclatura:

- 1) **Camundongos NOD controle:** animais não tratados que atingiram a 28^a semana sem tornarem-se diabéticos;
- 2) **Camundongos NOD *P. alata*:** animais tratados com extrato aquoso das folhas de *P. alata* que atingiram a 28^a semana sem tornarem-se diabéticos;
- 3) **Camundongos NOD diabéticos:** animais que tornaram-se diabéticos, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado, até a 28^a semana de vida.
- 4) **Camundongos BALB/c:** camundongos que não desenvolvem o diabetes, utilizados como controle de reação nas metodologias: Tolerância à glicose e análise de estresse oxidativo e células apoptóticas.

Os grupos experimentais foram divididos em NOD *P.alata*, NOD controle e NOD diabético para análise de todos os resultados. Os animais diabéticos que consumiram o extrato aquoso e os que consumiram água foram unidos ao grupo diabético.

5.1. Controle biológico do extrato aquoso

O controle biológico foi realizado em placas com meio Saborou antes de o extrato aquoso ser oferecido para os animais e após o seu consumo. Em nenhuma análise apresentou contaminação desse extrato.

5.2. Efeito do tratamento com extrato aquoso sobre a manifestação do diabetes mellitus

O desenvolvimento do *diabetes mellitus* nos camundongos NOD é resultado da destruição das células β nas ilhotas pancreáticas por meio de um processo inflamatório

autoimune (87). A hiperglicemia e o início do diabetes nesses animais são atribuídos à infiltração de leucócitos auto-reativos nas ilhotas de Langerhans (88).

O tratamento dos camundongos NOD com extrato aquoso de *Passiflora alata* foi capaz de reduzir a manifestação do diabetes, uma vez que apenas 38% dos animais tratados (n=16/42) apresentaram níveis glicêmicos ≥ 250 mg/dL. Por outro lado, entre os animais controle, sem tratamento, verificou-se a ocorrência de 63,3% da doença (n=19/30), com diferença de 25,3% (figura 3, pág.73).

5.3. Consumo do extrato aquoso de *P.alata*

O consumo de água e extrato aquoso dos camundongos NOD era mensurado a cada dois dias. Os resultados do consumo de água ($32,7 \pm 3,06$ mL/animal) e extrato aquoso ($33,4 \pm 2,4$ mL/animal) não apresentaram diferença estatística significativa entre os dois grupos (figura 4, pág. 73).

5.4. Efeito do tratamento com as folhas de *P. alata* sobre o processo inflamatório e índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas

As ilhotas pancreáticas dos camundongos NOD foram classificadas segundo o grau de infiltrado celular, onde grau 0 corresponde a ausência de infiltrado celular, 1 corresponde uma ilhota com até 25% de células inflamatórias, de 25 a 80% de infiltrado as ilhotas são classificadas como de grau 2, grau 3 corresponde a mais de 80% de infiltrado e grau 4 corresponde a uma ilhota completamente comprometida pelo infiltrado inflamatório (figura 5, pág. 74).

Ilhotas dos grupos controle, diabético e *P. alata* eram classificadas segundo o grau de infiltrado celular (figura 6, pág. 75), sendo calculado também o índice de insulite nas ilhotas pancreáticas, demonstrado na figura 7, pág. 75.

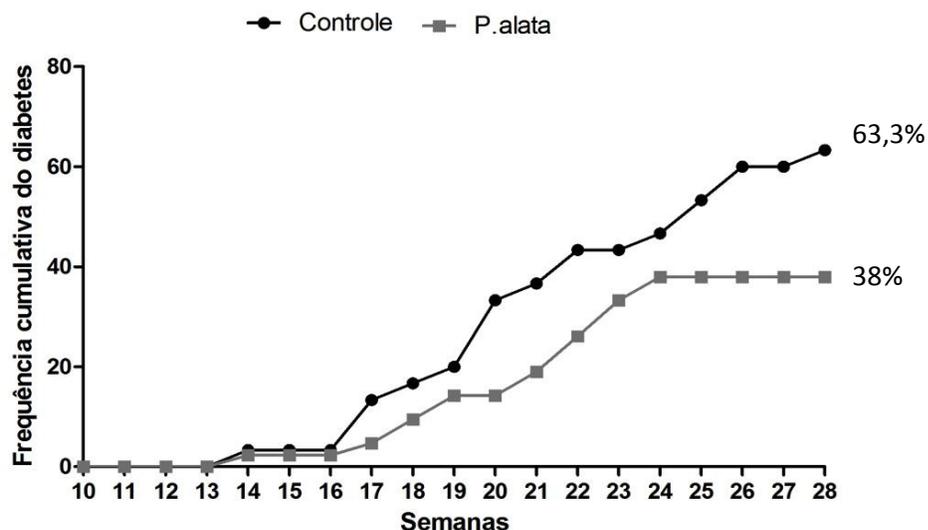


Figura 3: Frequência cumulativa sobre a incidência do diabetes nos camundongos NOD submetidos ao tratamento com extrato aquoso de *P.alata* ou controle. Observa-se que 38% (16/42) dos animais tratados ficaram diabéticos, enquanto 63,3% (19/30) apresentaram a doença. Diferença entre as frequências de 25,3%.

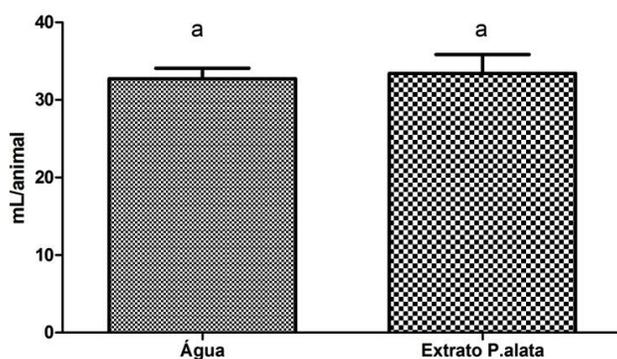


Figura 4: Consumo semanal de água e extrato aquoso dos camundongos NOD. Consumo de água 32,7± 3,06 mL/animal; Consumo de extrato aquoso 33,4±2,4 mL/animal. Teste estatístico *t-Student*, com marcador estatístico "a".

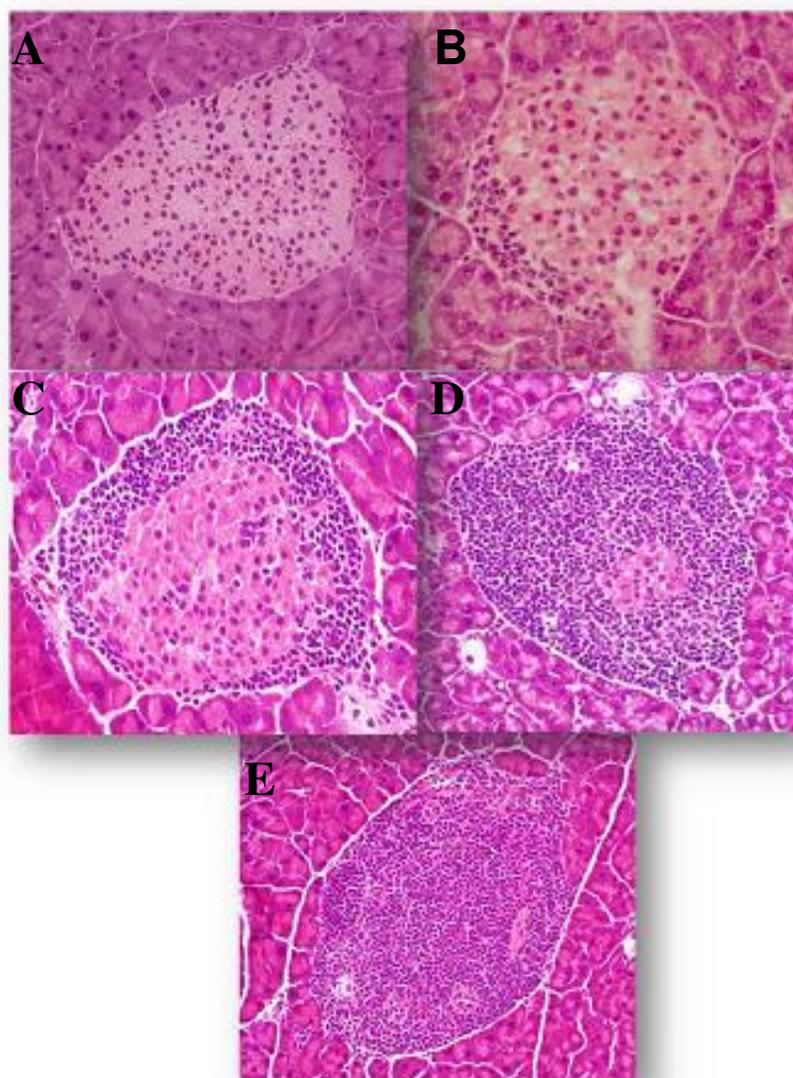


Figura 5. Imagem representativa de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em diferentes graus de infiltração celular. A) Grau 0 (0%); B) Grau 1 (< 25%); C) Grau 2 (25 - 80%); D) Grau 3 (> 80%); E) Grau 4 (100%).

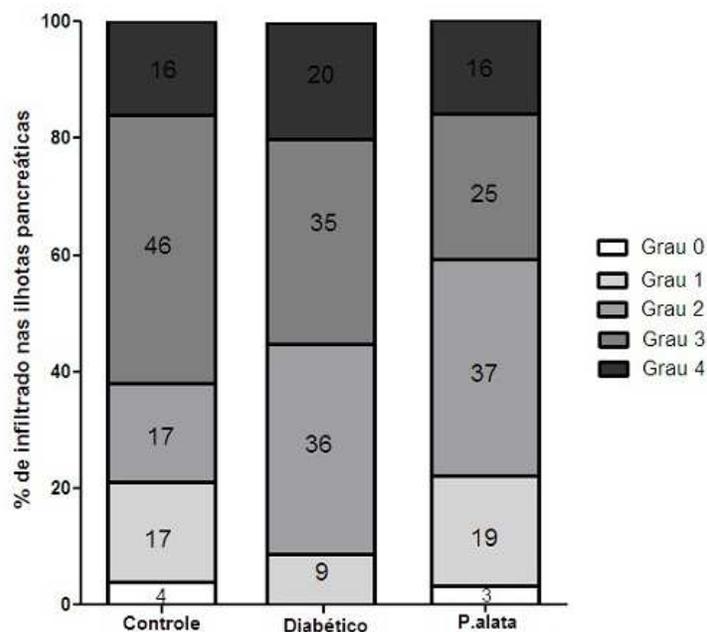


Figura 6: Gráfico representativo da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongo NOD controle (n=5), diabético (n=5), NOD *P.alata* (n=5). Número de ilhotas analisadas em cada grupo = 300.

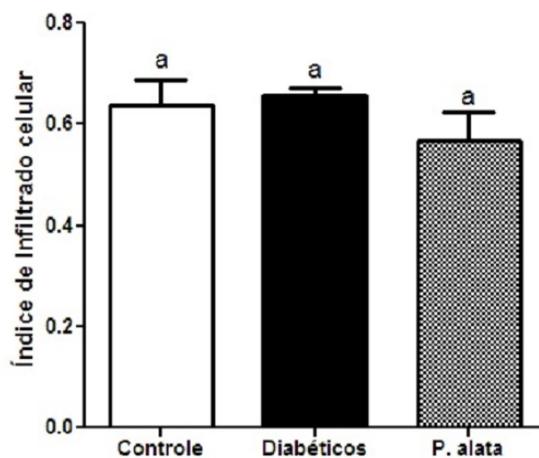


Figura 7. Gráfico representativo do Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD dos grupos controle, diabético e *P.alata*, com valores referentes ao índice de infiltrado e erro padrão, respectivamente, 0,6389±0,05, 0,6584±0,01 e 0,5675±0,05. Os resultados estão expressos por média ± erro padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. NOD controle (n=5); diabético (n=5); NOD *P.alata* (n=5). 300 ilhotas foram analisadas por grupo. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, com marcador estatístico "a".

5.5. Teste de tolerância à glicose em camundongos NOD e BALB/c

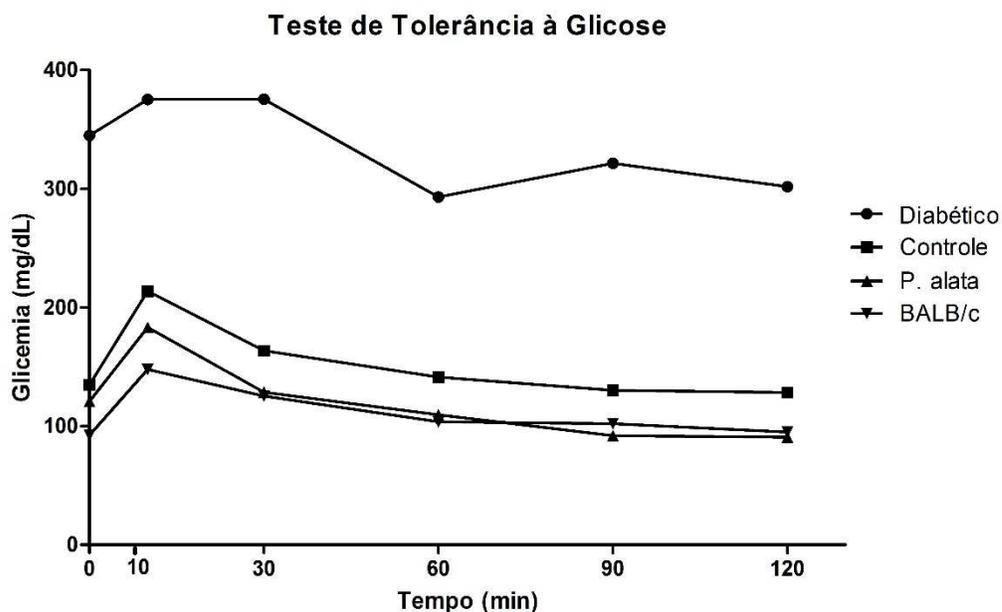


Figura 8: Concentração de glicemia (mg/dL) durante o teste de tolerância à glicose em camundongos NOD dos grupos Diabético, Controle, *P.alata* e BALB/c.

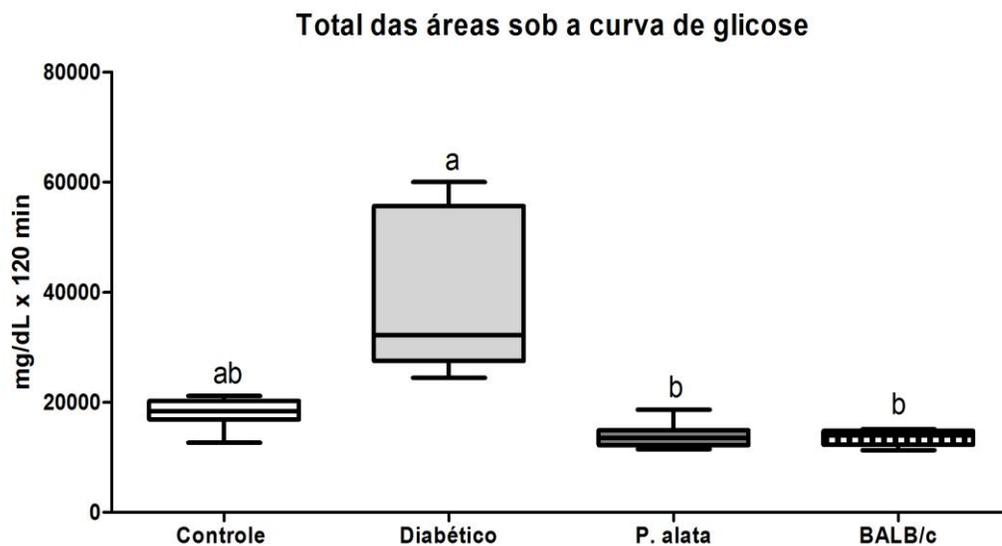


Figura 9: Análise estatística da área sob a curva de glicose em camundongos NOD dos grupos Diabético, Controle, *P.alata* e camundongos BALB/c. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,01$.

5.6. Níveis de Insulina Sérica

Observamos diferença estatística significativa de insulina entre os animais diabéticos e do grupo controle, não havendo diferença entre os grupos controle e *P. alata*, que apresentaram valores superiores na concentração sérica de insulina quando comparados aos animais diabéticos, sendo os valores de média e erro padrão 2,16 ng/mL \pm 0,26; 2,13 \pm 0,35; 1,3 \pm 0,15 nos grupos controle, *P. alata* e diabético, respectivamente (figura 10, pág. 78). É provável que o grupo *P. alata* não tenha apresentado diferença com o grupo diabético devido à maior dispersão de valores entre as amostras quando comparadas as amostras do grupo controle, e conseqüente aumento de erro padrão neste grupo.

5.7. Estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD

A análise do estresse oxidativo nas ilhotas (Kit Oxidative Stress) foi realizada nos pâncreas dos camundongos dos grupos *P.alata*, controle e diabético. Os resultados estão apresentados como imagem representativa de cada grupo (prancha I, pág. 79), porcentagem de estresse oxidativo e seus respectivos graus (figura 11, pág. 80) e análise da média e erro padrão do estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas, tendo sido calculada pela porcentagem de área marcada (figura 12, pág. 80). O padrão do estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas entre os grupos mostrou diferença estatística entre *P.alata*/controle ($p < 0,001$), *P.alata*/diabético ($p = 0,01$) e controle/diabético ($p = 0,05$). O estresse oxidativo está diminuído no grupo *P.alata* quando comparado aos demais grupos. As médias/erro padrão dos grupos *P.alata*, controle e diabético foram, respectivamente, 13,7% \pm 2,5; 56,6% \pm 6,6 e 37,7% \pm 4,5, valores definidos pela porcentagem de área marcada pelo estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas.

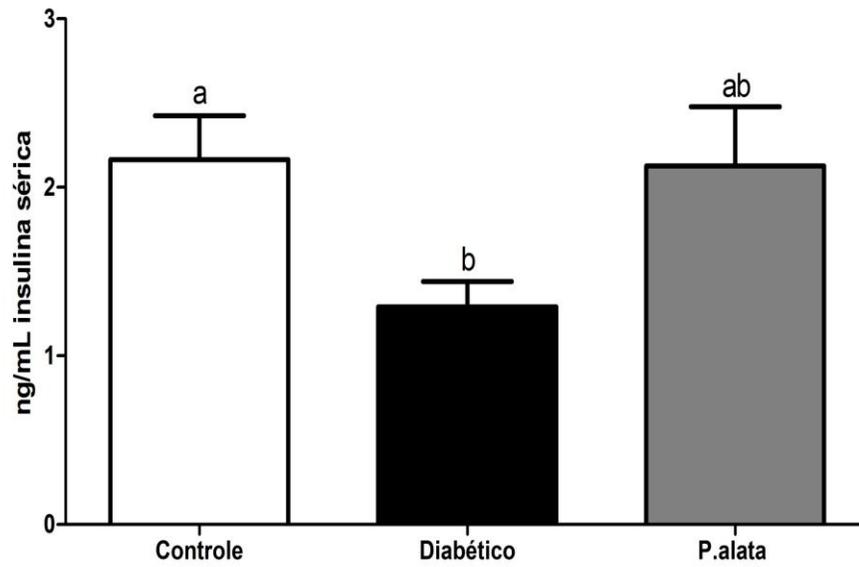
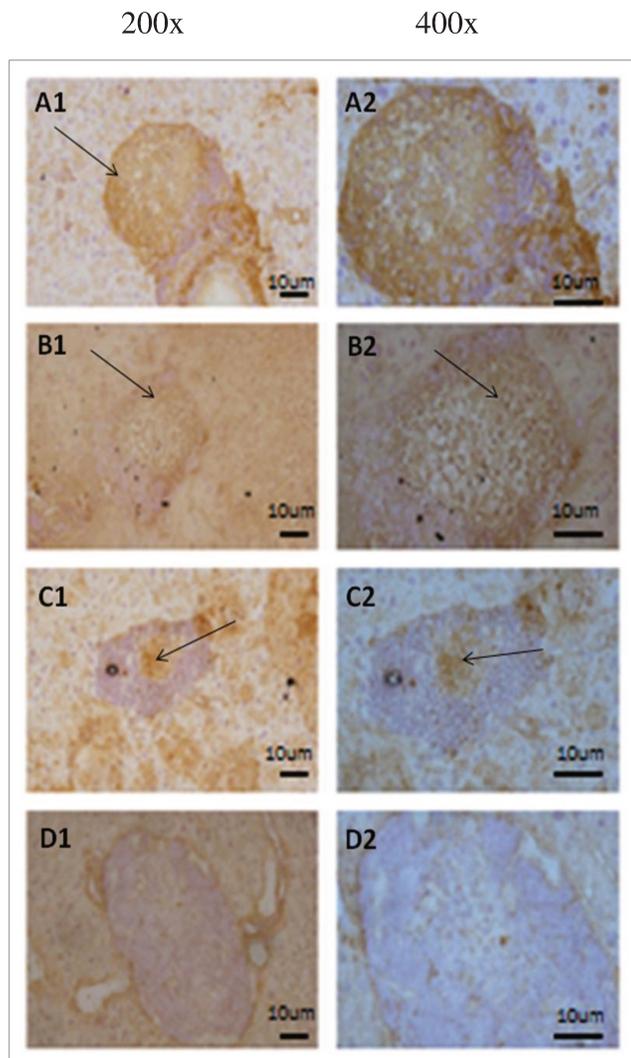


Figura 10. Dosagem sérica de insulina pelo método enzimático ELISA em camundongos NOD do grupo controle (n=15), diabético (n=15) e *P.alata* (n=15). Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.



Prancha I: Fotomicrografia dos cortes pancreáticos representando a presença de estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD e BALB/c como controle de linhagem não relacionada. (n=9). 90 ilhotas analisadas por grupo. NODs A) controle; B) diabético; C) *P.alata*; D) BALB/c, as setas em detalhe a direita indicam marcação do estresse oxidativo.

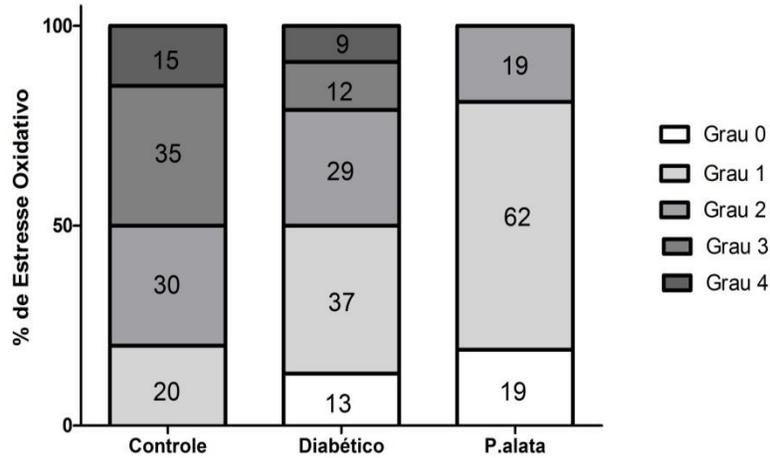


Figura 11: Gráfico representativo da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de estresse oxidativo em camundongo NOD controle (n=3), tratado com *P.alata* (n=3) e diabético (n=3). 90 ilhotas por grupo foram analisadas.

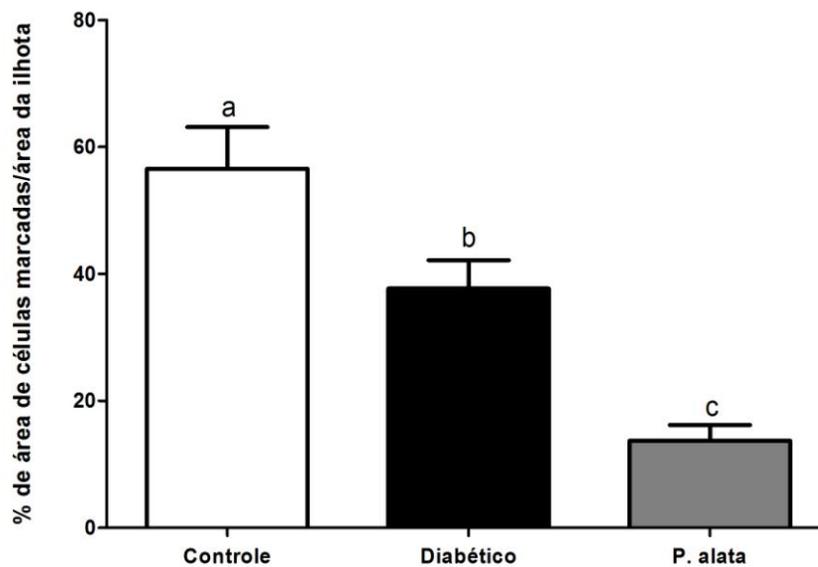


Figura 12: Gráfico representativo da área de correspondente a presença de células positivas marcadas pelo estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas em camundongo NOD controle (n=3), NOD *P.alata* (n=3) e diabético (n=3). 90 ilhotas por grupo foram analisadas. Teste estatístico ANOVA de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p<0,05; a/c: p<0,001; b/c: p<0,01.

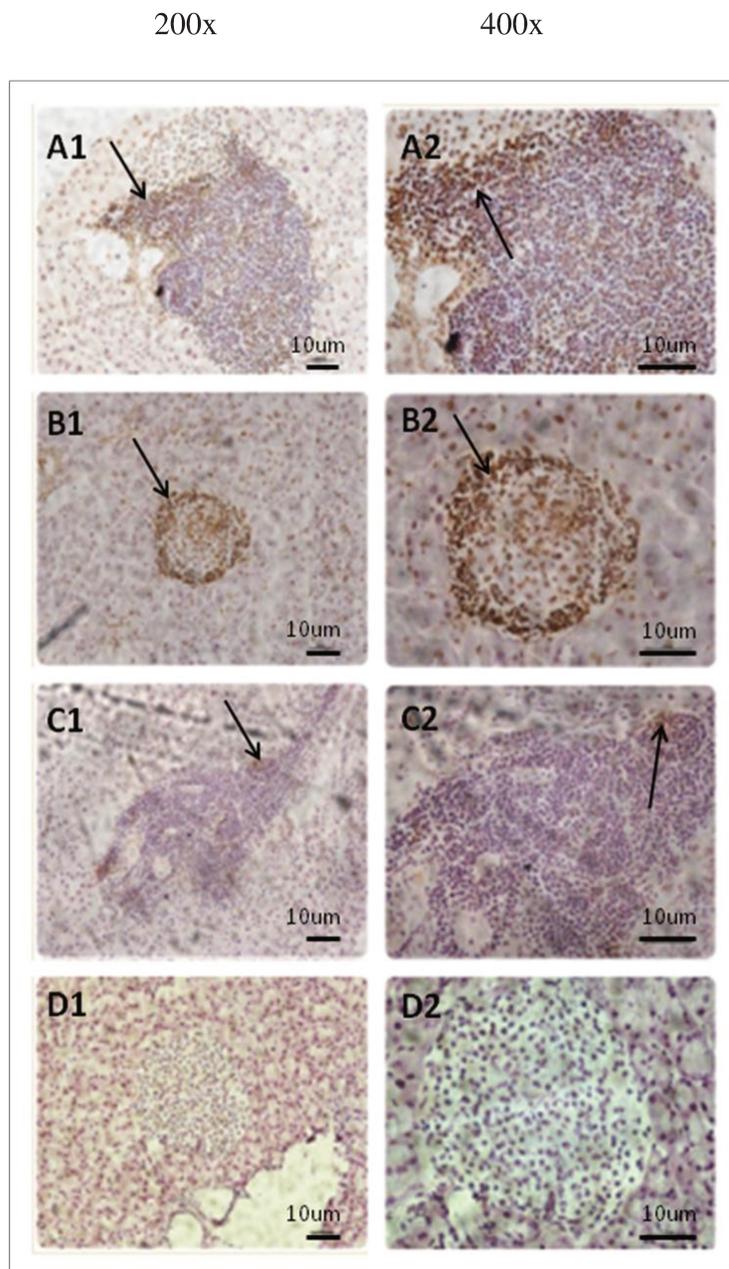
5.8. Células apoptóticas nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD

As células em apoptose foram identificadas pela coloração castanha na técnica do Túnel (prancha II, pág.82). Nos animais do grupo *P.alata* foram identificadas ilhotas de grau 1 em maior quantidade quando comparados aos demais grupos. Ilhotas de grau 4, por sua vez, foram encontradas em maior quantidade nos grupos controle e diabético (figura 13, pág. 83). A análise da média e erro padrão de área marcada de apoptose/área total da ilhota não apresentou diferença estatística entre os grupos, embora o grupo *P.alata* apresente tendência a um menor número de células em apoptose quando comparado aos grupos controle e diabético. As médias de valores/erro padrão referentes à porcentagem de células apoptóticas nas ilhotas pancreáticas foram $34,5\% \pm 8,1$; $54,3\% \pm 9,1$; $50,3\% \pm 7,1$ nos grupos *P.alata*, controle e diabético, respectivamente (figura 14, pág. 83).

5.9. Imunofenotipificação dos infiltrados celulares nas ilhotas pancreáticas

As pranchas abaixo (III, pág. 84; IV, pág. 85 e V, pág. 86) mostram a fenotipificação do infiltrado celular (TCD4⁺, TCD8⁺ e macrófagos CD11⁺) e análise estatística de cada subgrupo estudado. A análise estatística de TCD4⁺ apresentou valor médio de porcentagem de infiltrado na ilhota e erro padrão $20,3\% \pm 4,5$; $27,7\% \pm 3,9$ e $13,1\% \pm 3,1$ (figura 15, pág. 84) nos grupos controle, diabético e *P.alata*, respectivamente. Os linfócitos TCD8⁺ apresentaram os valores $26,5\% \pm 4,1$; $27,4\% \pm 5,5$; $22,2\% \pm 3,2$ (figura 16, pág. 85) e macrófagos obtiveram as medias de porcentagem de ilhota marcada $25,3\% \pm 4,9$; $20,7\% \pm 5,4$ e $10,6\% \pm 3,8$ (figura 17, pág. 86) nos grupos controle, diabético e *P.alata*, respectivamente. Diferença estatística foi constatada entre os grupos *P.alata*/diabético ($p=0,01$) para TCD4⁺ e controle/*P.alata* ($p=0,05$) para macrófagos CD11.

Foi realizada também a análise das ilhotas pancreáticas em diferentes graus de infiltrado celular de CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos CD11⁺ (figura 18, pág. 87).



Prancha II: Fotomicrografia dos cortes pancreáticos representando a presença das células apoptóticas nas ilhotas pancreáticas nos camundongos NOD e BALB/c (controle de linhagem não relacionada). N=9. 90 ilhotas por grupo analisadas. A) Controle não diabético; B) Diabético; C) NOD *P.alata* não diabético; D) BALB/c corte controle. Setas indicam marcação de apoptose. Ampliação 200 e 400 vezes, barra 10µm.

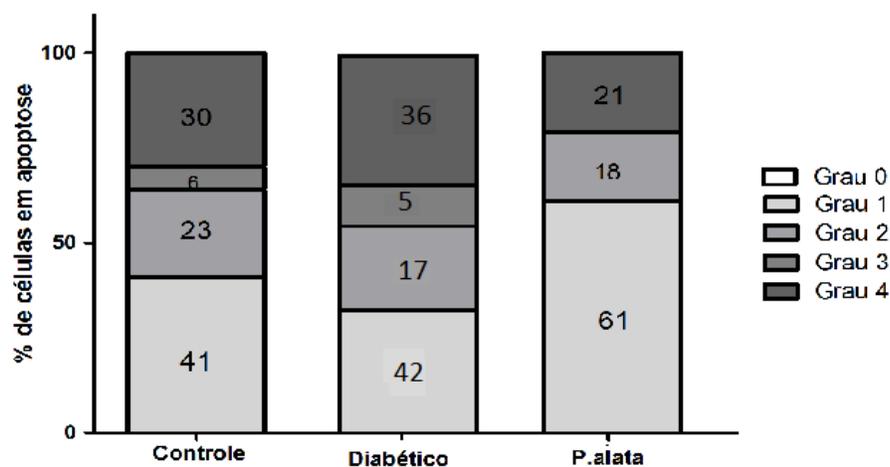


Figura 13: Gráfico representativo da porcentagem de células apoptóticas a partir da classificação do grau de insulite no camundongo NOD controle (n=3), NOD *P.alata* não diabético (n=3) controle diabético (n=3). 90 ilhotas pancreáticas por grupo foram analisadas.

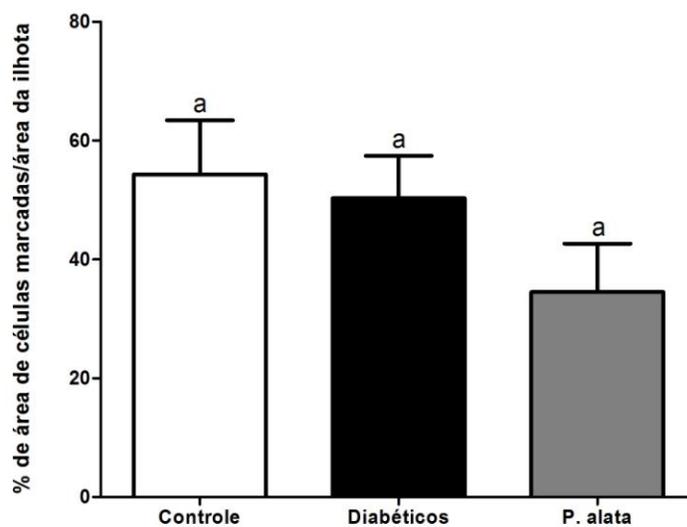
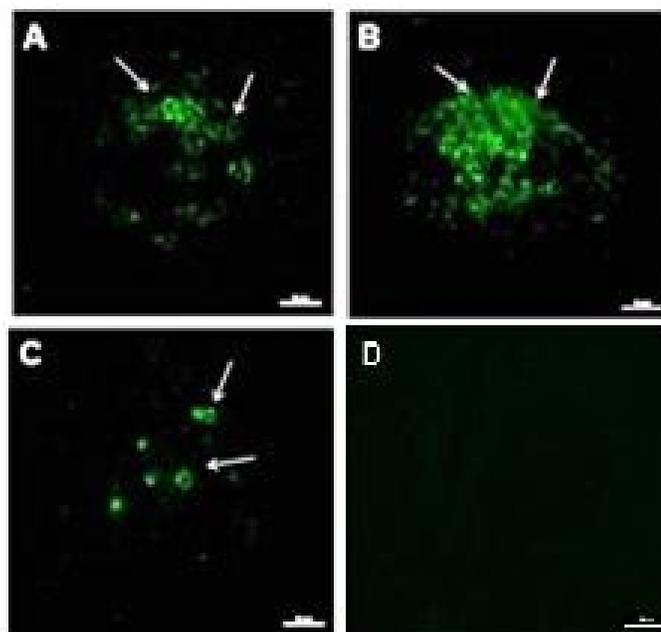


Figura 14: Gráfico representativo da distribuição nas ilhotas pancreáticas de células apoptóticas considerando a relação entre a área e número de células marcadas na ilhota. NOD controle (n=3), tratado com *P.alata* (n=3) e diabético (n=3). 90 ilhotas por grupo foram analisadas. Teste estatístico ANOVA de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, com marcador estatístico "a".



Prancha III: Fotomicrografia representativa do infiltrado de linfócitos TCD4⁺ em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). NODs A) controle; B) diabético; C) *P.alata*; D) Controle negativo do procedimento. Setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10uM.

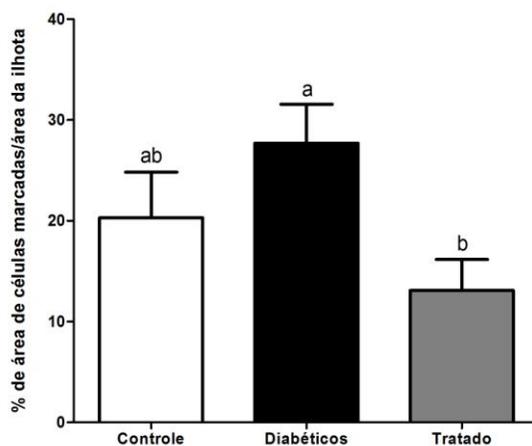
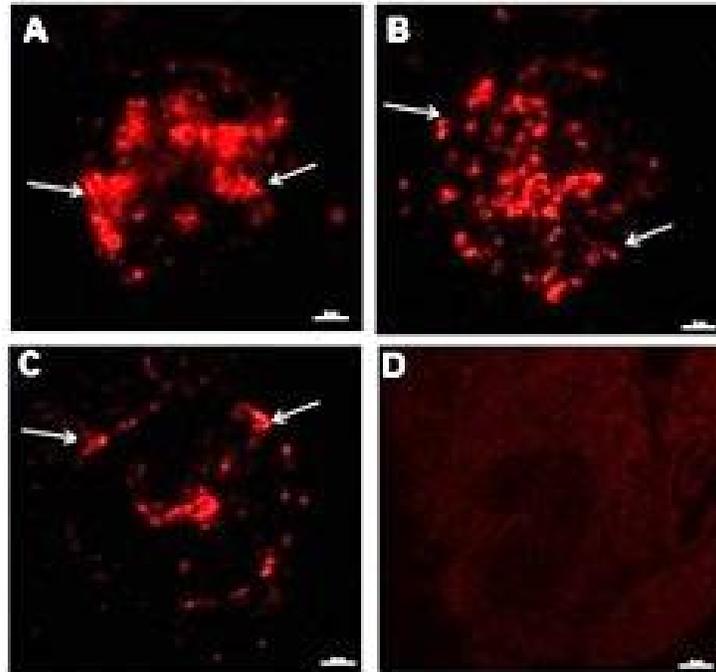


Figura 15. Gráfico representativo da porcentagem de infiltrado TCD4⁺ considerando a área da ilhota e a área de células marcadas. NOD controle não diabético (n=3), NOD *P.alata* (n=3) e controle diabético (n=3). 90 ilhotas pancreáticas por grupo foram analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,01.



Prancha IV: Fotomicrografia representativa do infiltrado de linfócitos TCD8⁺ em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). NODs A) controle; B) diabético; C) *P.alata*; D) Controle negativo do procedimento. Setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm.

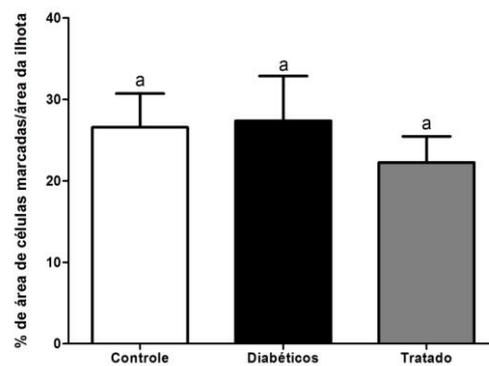
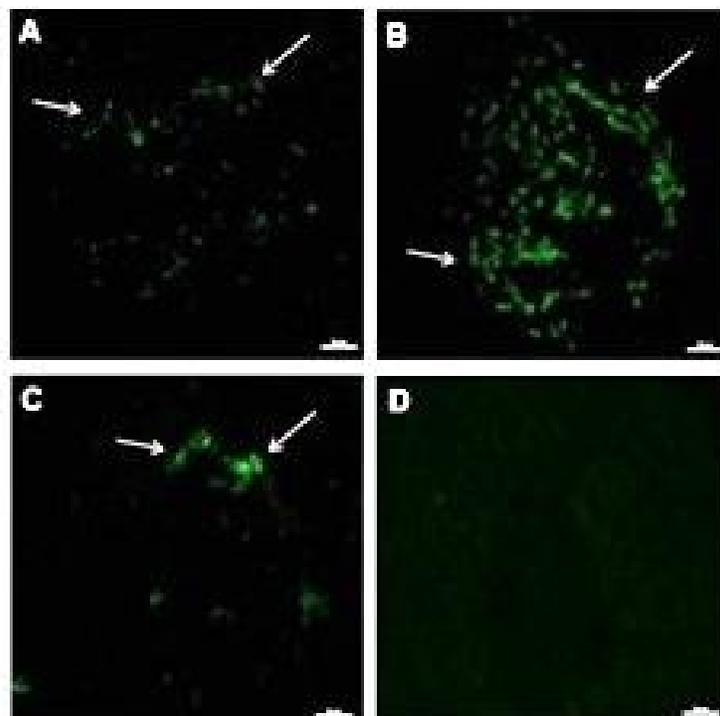


Figura 16: Gráfico representativo da porcentagem de infiltrado LTCD8⁺ considerando a área da ilhota e a área de células marcadas. NOD controle não diabético (n=3), NOD *P.alata* não diabético(n=3) e controle diabético (n=3). 90 ilhotas pancreáticas por grupo foram analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, com marcador estatístico "a".



Prancha V: Fotomicrografia representativa do infiltrado de células CD11⁺ em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). NODs A) controle; B) diabético; C) *P.alata*; D) Controle negativo do procedimento. Setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm.

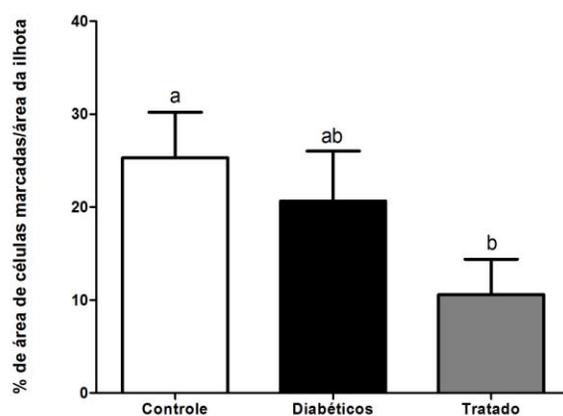


Figura 17: Gráfico representativo da porcentagem de infiltrado CD11c⁺ considerando a área da ilhota e a área de células marcadas. NOD controle não diabético (n=3), NOD *P.alata* (n=3) e controle diabético (n=3). 90 ilhotas pancreáticas por grupo foram analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,05.

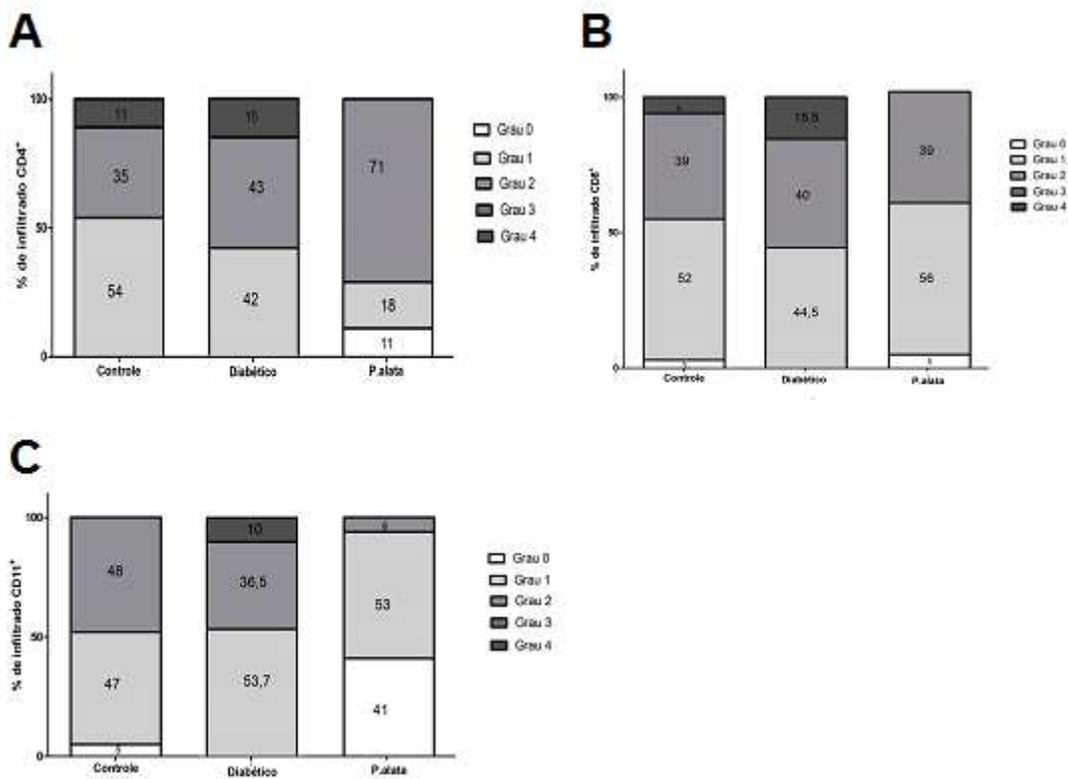


Figura 18. Gráfico representativo dos infiltrados celulares, considerando o grau de insulite. A) Linfócitos TCD4⁺; B) Linfócitos TCD8⁺; C) Macrófagos CD11c⁺. Foram analisados os grupos NOD controle não diabético (n=3), NOD *P.alata* não diabético (n=3) e controle diabético (n=3), 90 ilhotas por grupo foram analisadas.

5.10. Imunofenotipificação de células insulina+, glucagon+, somatostatin+, GLP-1+ e dos fatores de transcrição NGN3+ e PDX-1+

Na análise de porcentagem de células insulino+, o grupo *P.alata* apresentou número superior de células marcadas quando comparado aos demais (prancha VI, pág. 90). A análise da imunofenotipificação de insulina apresentou diferença estatística entre os três grupos; controle/diabético ($p < 0,001$), *P.alata*/controle ($p = 0,001$) e *P.alata*/diabético ($p < 0,05$) (figura 19, pág. 90). Os valores referentes à média da porcentagem de expressão nas ilhotas pancreáticas e erro padrão de cada grupo foram $57,1\% \pm 3,8$; $9,4\% \pm 3,8$ e $75,3\% \pm 4,6$ para os grupos controle, diabético e *P.alata*, respectivamente.

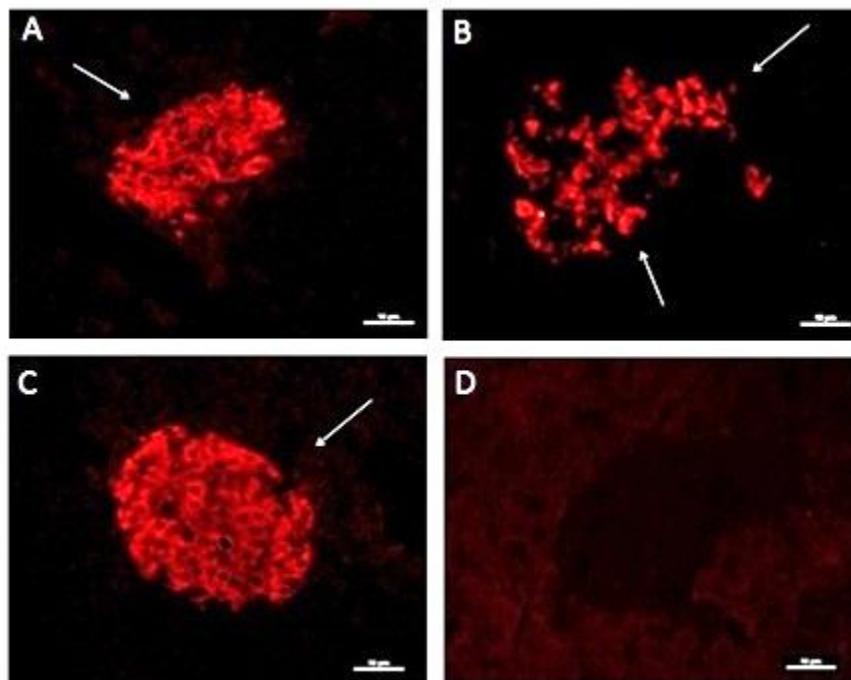
A análise da expressão de células glucagon+ (prancha VII, pág. 91) mostrou elevação destas células para o grupo diabético quando comparado aos demais e apresentou diferença estatística entre os grupos diabético/controle e diabético/*P.alata* ($p = 0,001$). As médias de porcentagem de expressão de células marcadas nas ilhotas pancreáticas e erro padrão dos grupos controle, diabético e *P.alata* foram, respectivamente, $28,8\% \pm 2$; $53,9\% \pm 3,2$ e $33,5\% \pm 3,9$ (figura 20, pág. 91).

A média da porcentagem de células marcadas de somatostatina (prancha VIII, pág. 92) nas ilhotas do grupo diabético ($64,6\% \pm 3,9$) foi maior quando comparada aos grupos *P.alata* ($36,1\% \pm 3,5$) e controle ($47\% \pm 3,4$). Assim como glucagon, observamos maior número de células marcadas por somatostatina no grupo diabético, mas o grupo *P.alata* apresentou menor expressão quando comparado ao grupo controle. Houve diferença estatística entre os grupos diabético/controle ($p = 0,05$) e diabético/*P.alata* ($p < 0,001$) (figura 21, pág. 92).

A análise do GLP-1 (prancha IX, pág. 93) apresentou diferença estatística entre os grupos *P.alata*/controle e diabético/controle ($p = 0,01$). As médias de porcentagem de ilhota

marcada e erro padrão foram $17,6\% \pm 2,5$; $33,7\% \pm 3,8$ e $33,6\% \pm 4,1$ nos grupos controle, diabético e *P.alata*, respectivamente (figura 22, pág. 93)

Os fatores de regeneração PDX-1 (prancha X, pág. 94) e NGN-3 (prancha XI, pág. 94) não apresentaram marcação nas ilhotas pancreáticas.



Prancha VI: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células insulina+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a imunomarcagem. Aumento de 200x. Barra=10µm.

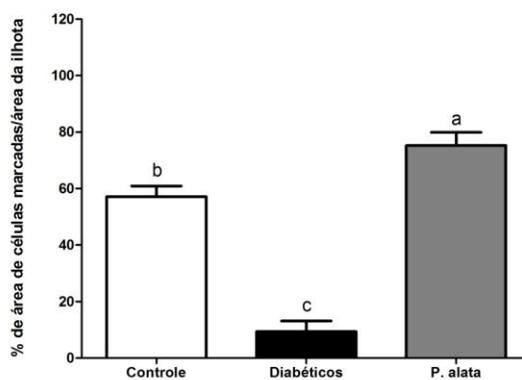
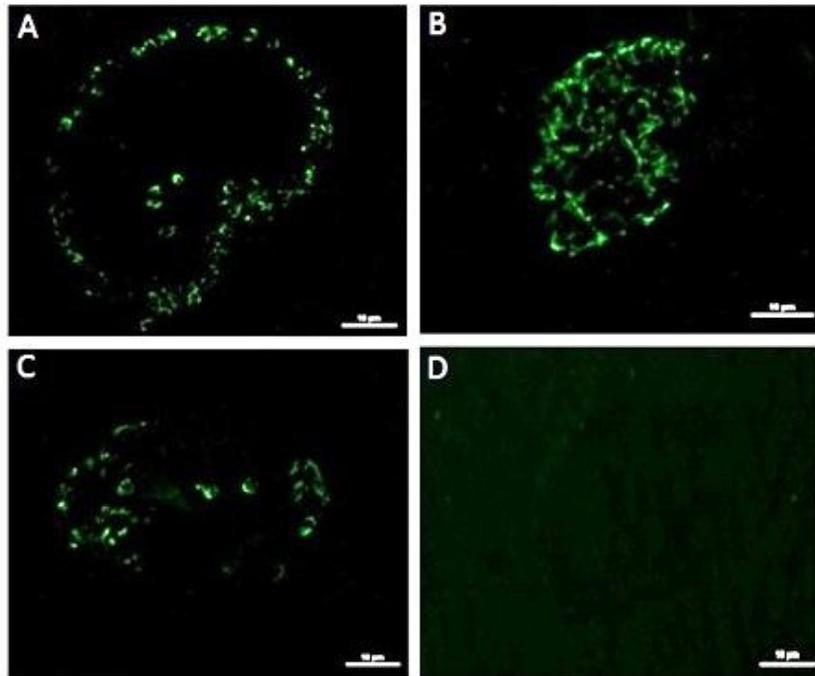


Figura 19: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células insulino+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *P.alata* não diabético. n=3, 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$; b/c: $p < 0,001$; a/c: $p < 0,05$.



Prancha VII. Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células glucagon+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a imunomarcagem. Aumento de 200x. Barra=10µm.

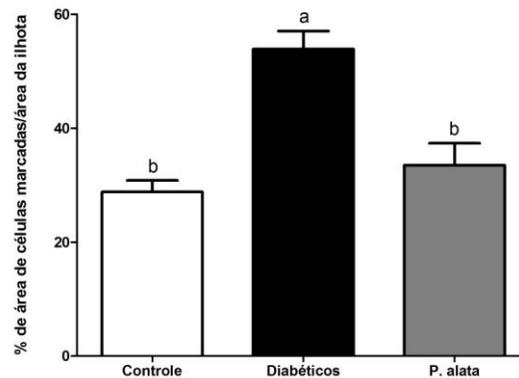
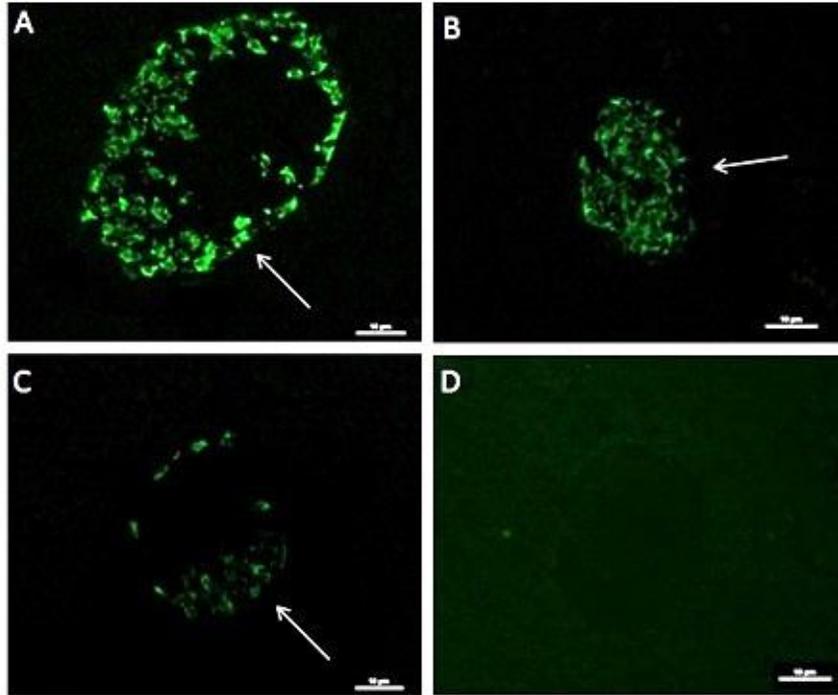


Figura 20: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células glucagon+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *P.alata* não diabético. n=9, 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,001.



Prancha VIII. Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células somatostatina+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a imunomarcagem. Aumento de 200x. Barra=10µm.

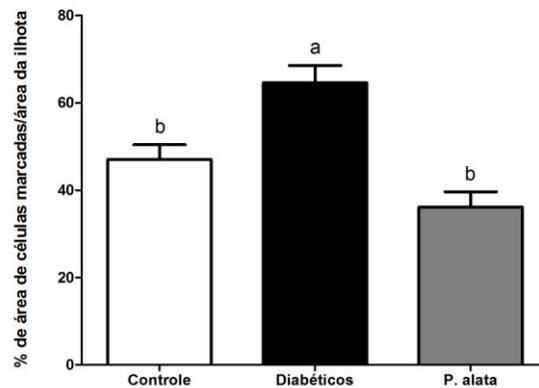
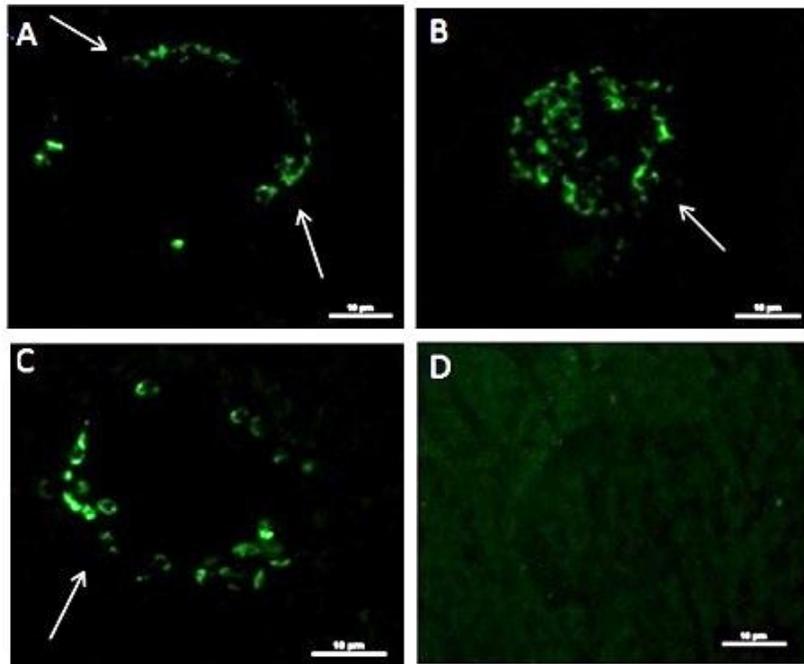


Figura 21: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células somatostatina+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e NOD *P.alata* não diabético. n=9, 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$; a/c: $p < 0,001$.



Prancha IX. Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células GLP-1+ nas ilhotas, NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm.

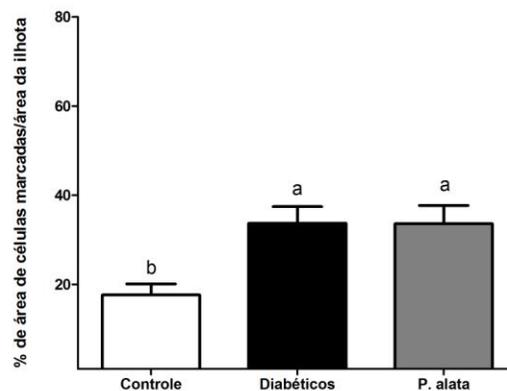
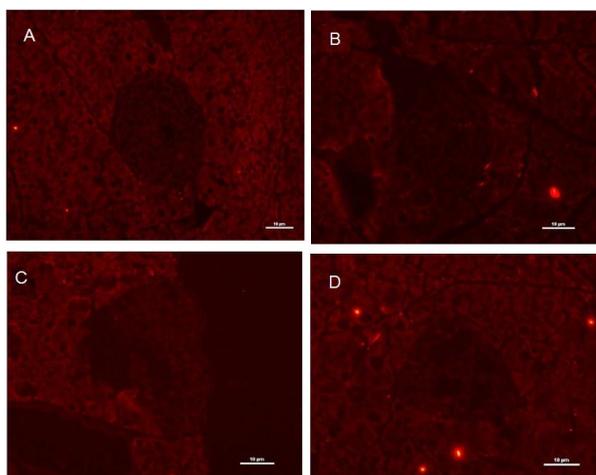
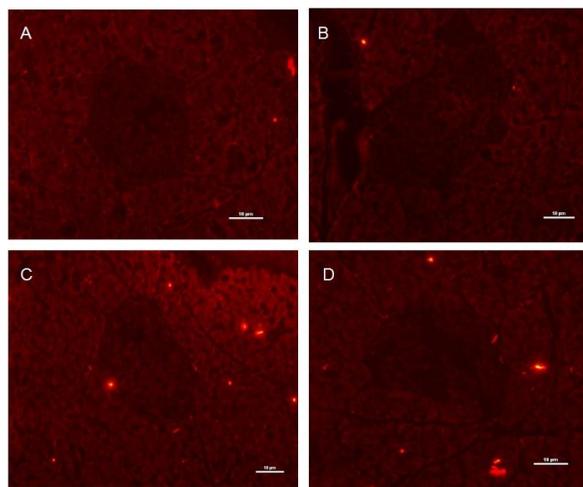


Figura 22: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células GLP-1+/área nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e NOD *P.alata* não diabético. n=9, 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: p< 0,01.



Prancha X. Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de Pdx1 em 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo) de camundongos NOD (n=9). NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. Aumento de 200x. Barra=10µm.



Prancha XI. Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de NGN3 em 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo) de camundongos NOD (n=9). NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. Aumento de 200x. Barra=10µm.

5.11. Imunofenotipificação das CDKs 1, 2, 4 e 6

As análises por imunofenotipificação das CDKs 1, 2, 4 e 6 estão representadas nas pranchas XII – pág. 97, XIII – pág. 98, XIV – pág. 99 e XV – pág. 100, e a porcentagem de área marcada de CDK6 das ilhotas esta representada (figura 23, pág. 101). As médias de porcentagem de células CDK6+ foram $68,9\% \pm 5,1$; $67,5\% \pm 5,4$; $29,6\% \pm 4,4$ nos grupos controle, diabético e *P.alata*, respectivamente. Houve diferença estatística entre os grupos *P.alata*/controle e *P.alata*/diabético ($p > 0,001$). Foi constatado pelas análises que a marcação de CDK6 acompanha a insulite nas ilhotas pancreáticas (prancha XVI, pág. 102).

Para finalizar os experimentos da imunofluorescência, foi realizada dupla marcação de CDK6 e linfócitos TCD8 (prancha XVII, pág. 103) para identificarmos em que célula a proteína estaria expressando e também marcação de anti-insulina (prancha XVIII, pág. 104) com a lâmina subsequente a lâmina utilizada na dupla marcação.

5.12. Expressão gênica – Insulina, Neuro-D, GLP-1, NGN3 e PDX-1

A partir das extrações de RNA total e síntese de cDNA das ilhotas pancreáticas de camundongos NOD dos grupos *P.alata*, controle e diabético, foi realizada a técnica de PCR em tempo real para análise de expressão gênica de insulina, neuro-d, GLP-1, PDX-1 e NGN3 em ilhotas pancreáticas. A quantificação absoluta era realizada antes da quantificação relativa para que fossem estabelecidas as curvas de eficiência gênica de cada primer. As curvas tiveram eficiência de 99 a 101% e estão demonstradas em anexo.

Após quantificação absoluta de cada primer, foram realizadas as quantificações relativas dos genes Insulina, Neuro-D, GLP-1, PDX-1 e NGN3 (figura 24, pág. 105).

Para análise da expressão gênica, foi utilizada a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A expressão gênica de Insulina foi mais elevada nos camundongos do grupo *P.alata* e controle, havendo diferença

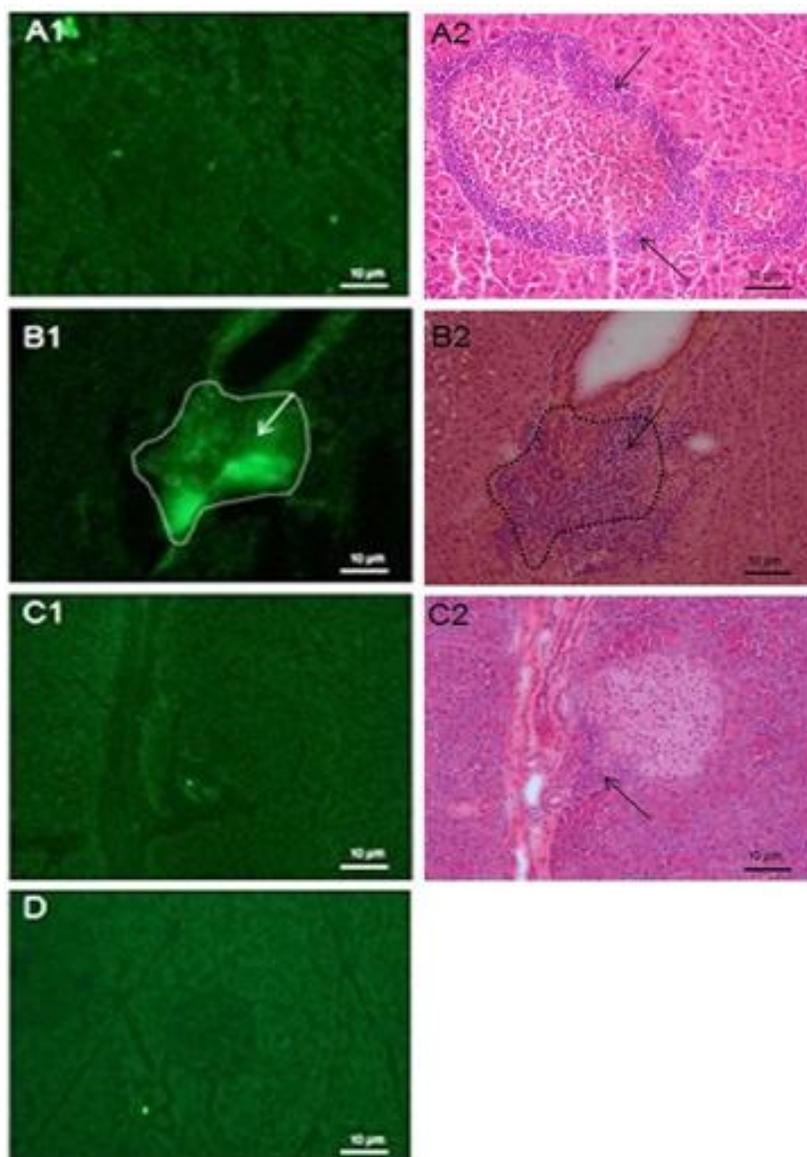
estatística entre os grupos controle/diabético e *P.alata*/diabético ($p=0,01$). Os valores referentes à fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e erro padrão foram $1,2 \pm 0,24$; $0,05 \pm 0,03$; $1,5 \pm 0,5$ nos grupos controle, diabético e *P.alata*, respectivamente (figura 24-A).

Já a expressão de GLP-1 foi superior no grupo *P.alata* ($2,3 \pm 0,3$) quando comparado aos grupos controle ($1,2 \pm 0,26$) e diabético ($1,2 \pm 0,23$) com diferença estatística entre *P.alata*/diabético ($p=0,05$) (figura 24-B).

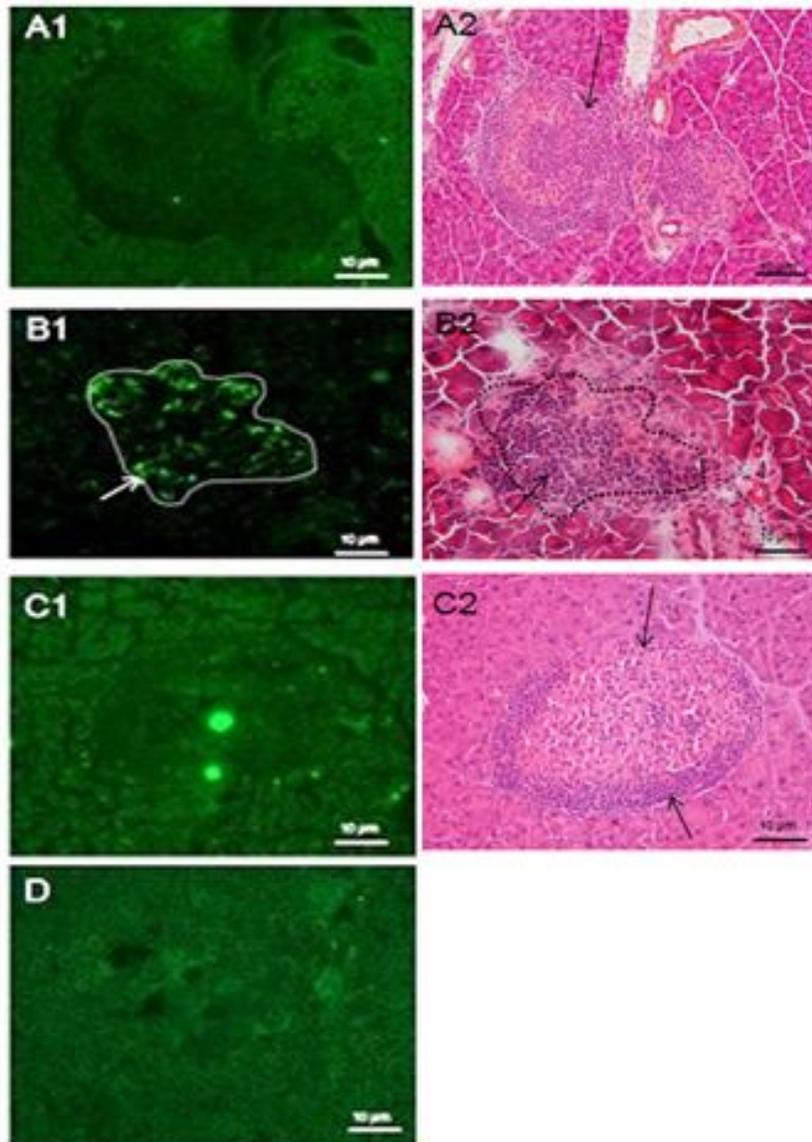
A análise de Neuro-D apresentou valores de expressão gênica $0,85 \pm 0,1$; $0,23 \pm 0,09$ e $0,98 \pm 0,3$ nos grupos controle, diabético e *P.alata*, mostrando-se superior no grupo *P.alata*, mas com diferença estatística entre os grupos controle/diabético e *P.alata*/diabético ($p=0,05$) (figura 24-C).

A expressão de PDX-1 foi maior nos grupos controle ($1,07 \pm 0,14$) e *P.alata* ($1,09 \pm 0,16$) quando comparados ao grupo diabético ($0,72 \pm 0,09$), embora não haja diferença estatística entre os grupos (figura 24-D).

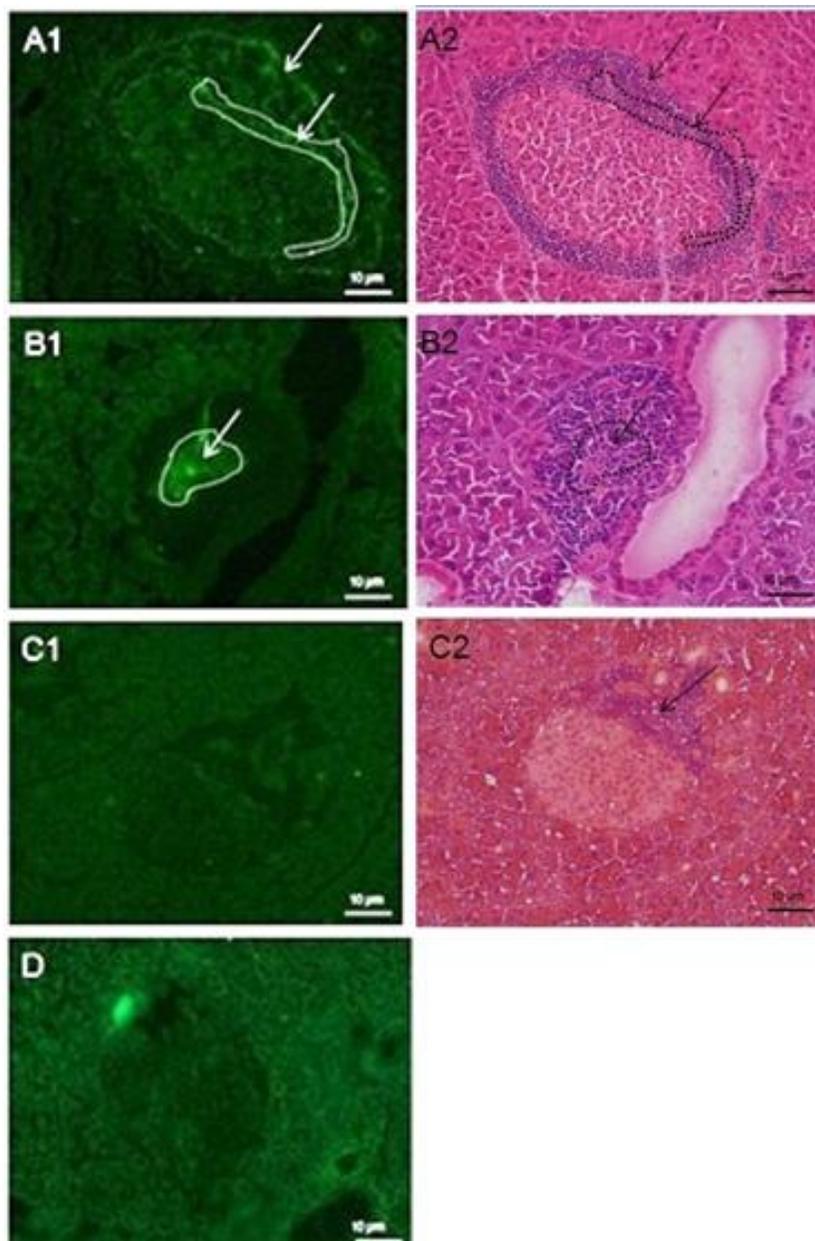
A análise de NGN3 não apresentou diferença estatística entre os grupos e os valores foram $0,98 \pm 0,13$; $1,3 \pm 0,36$ e $2,06 \pm 0,74$ nos grupos controle, diabético e *P.alata*, respectivamente (figura 24-E).



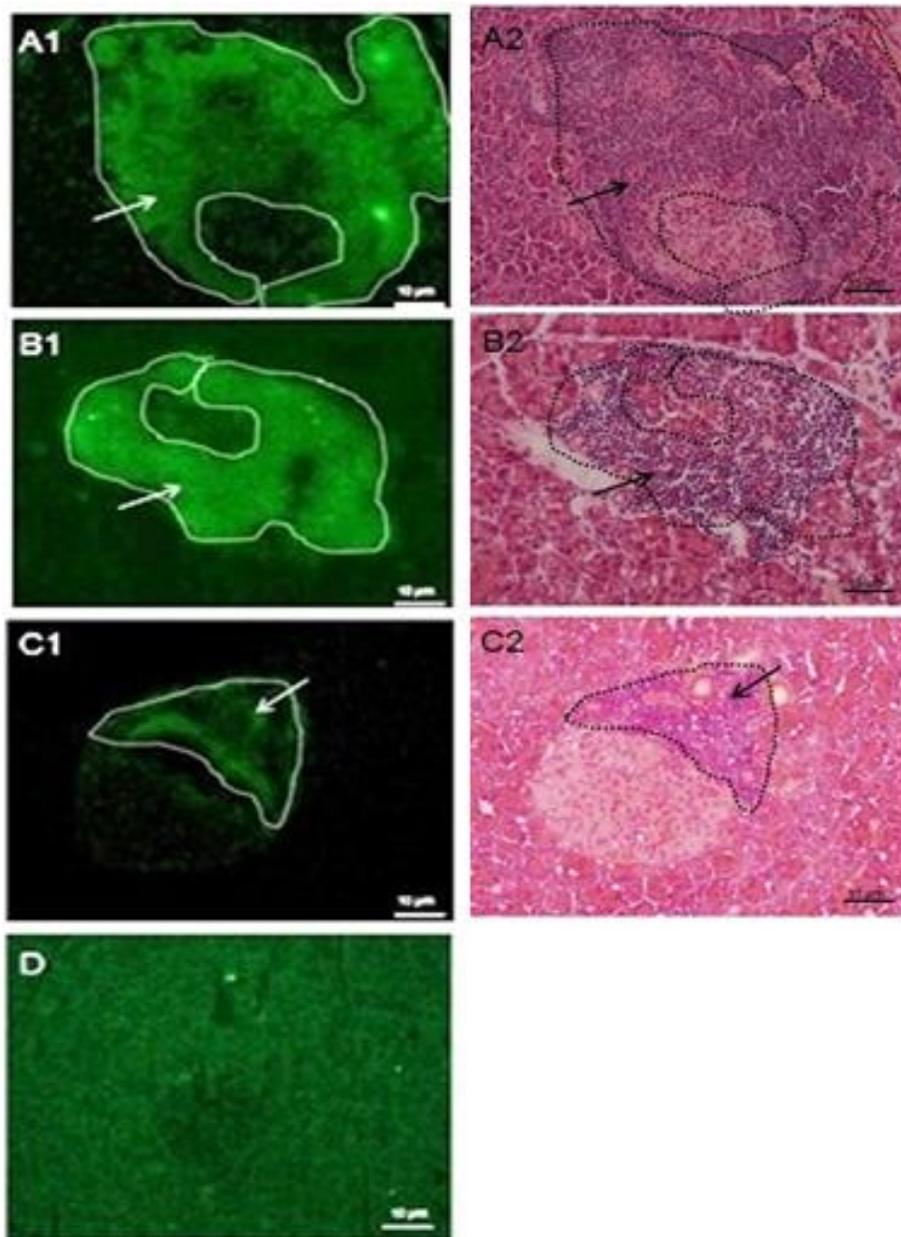
Prancha XII. Fotomicrografias representativas da imunofenotipificação de células CDK-1+ nas ilhotas. NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a CDK1+ (1) e infiltrado celular (2) e a delimitação corresponde à área de células CDK1+ coincidente com o infiltrado celular. Aumento de 200x. Barra=10 μ m.



Prancha XIII. Fotomicrografias representativas da imunofenotipificação de células CDK-2+ nas ilhotas. NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a CDK2+ (1) e infiltrado celular (2) e a delimitação corresponde à área de células CDK2+ coincidente com o infiltrado celular. Aumento de 200x. Barra=10 μ m.



Prancha XIV. Fotomicrografias representativas da imunofenotipificação de células CDK-4+ nas ilhotas. NODs A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a CDK4+ (1) e infiltrado celular (2) e a delimitação corresponde à área de células CDK4+ coincidente com o infiltrado celular. Aumento de 200x. Barra=10µm.



Prancha XV. Fotomicrografias representativas da imunofenotipificação de células CDK-6+ nas ilhotas. NODs. (A) controle (n=3), B) diabético (n=3), C) *P.alata* (n=3) e D) Controle negativo do procedimento. 90 ilhotas pancreáticas (30 ilhotas/animal por grupo). As setas apontam para a CDK6 (1) e infiltrado celular (2) e a delimitação corresponde à área de células CDK6+ coincidente com o infiltrado celular. Aumento de 200x. Barra=10μm.

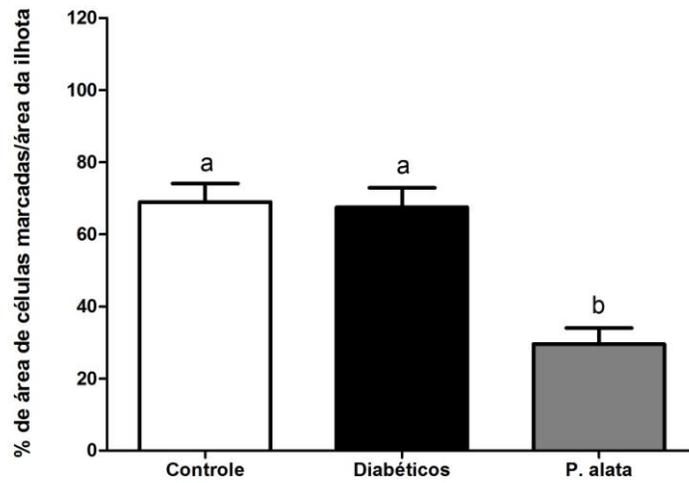
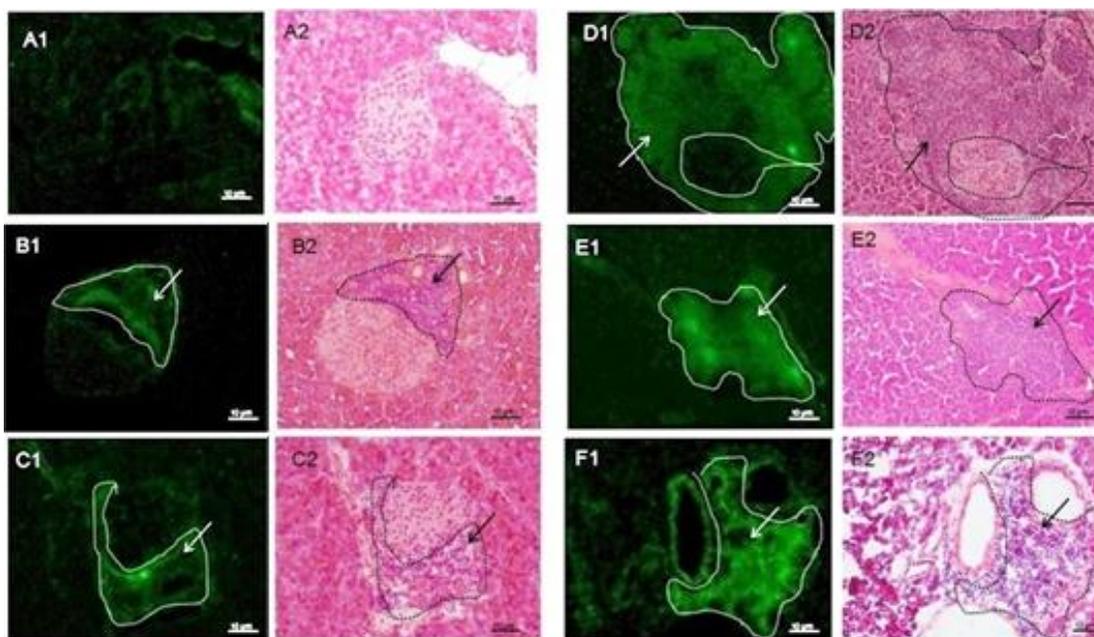
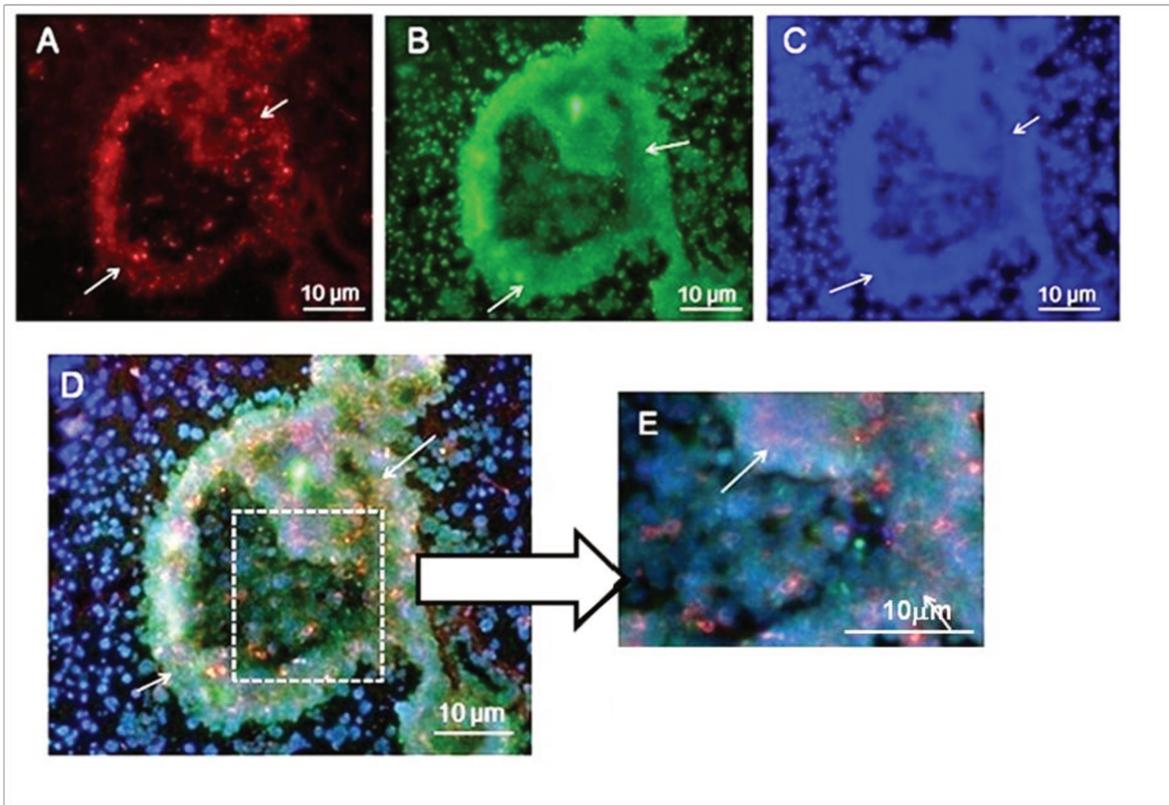


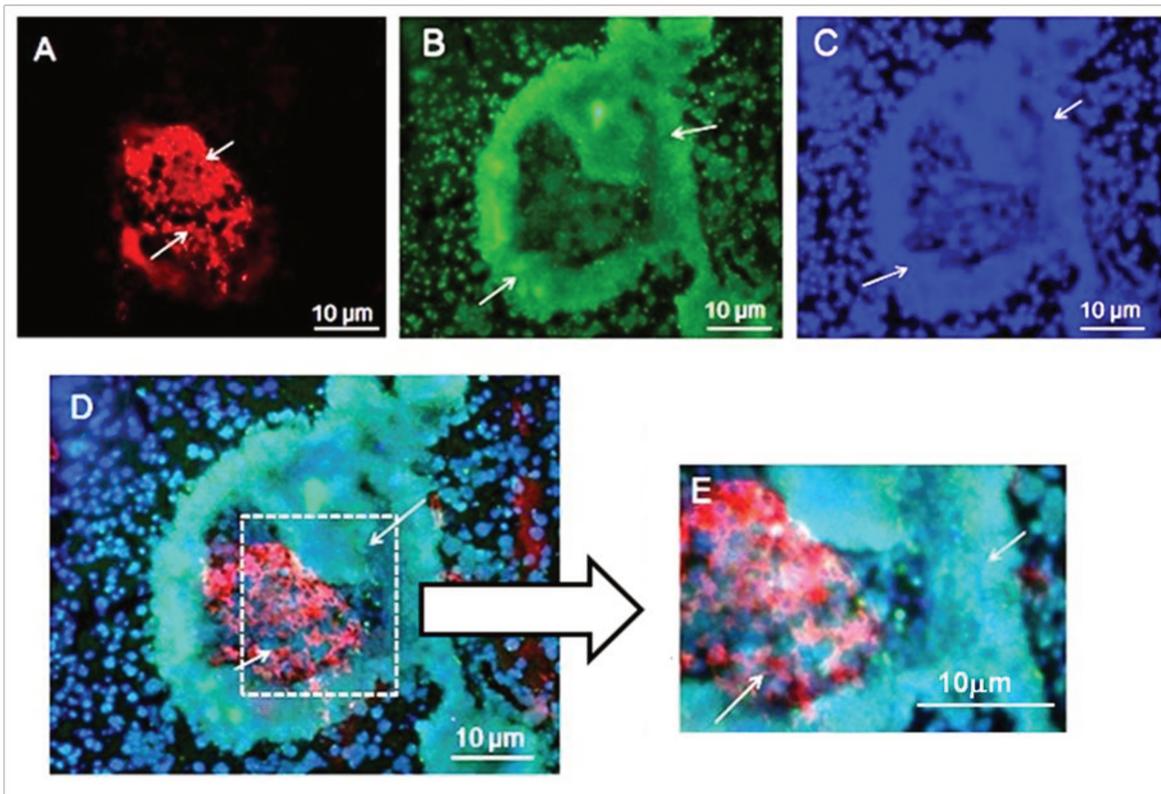
Figura 23: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células CDK-6+/área das ilhotas, Controle não diabético, Diabético e NOD *P.alata* não diabético. n=9. 90 ilhotas por grupo analisadas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$.



Prancha XVI. Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células CDK6+ nas ilhotas pancreáticas acompanhando a insulite em ilhotas de camundongos NOD. As imagens de A a F correspondem às ilhotas em diferentes graus de infiltrado celular e imunomarcção de células CDK6+. As setas correspondem as imunomarcações de CDK6+(1) e insulite (2) nas ilhotas e as delimitações demonstram a similaridade de localização de células CDK6+ e infiltrado celular.



Prancha XVII. Fotomicrografia representando dupla marcação de linfócitos TCD8+ e CDK6+ em ilhota pancreática de camundongos NOD. As setas apontam para a imunomarcação. Aumento de 200x - Barra=10μm; Aumento de 400x – Barra=10μm. A) TCD8 – Texas Red; B) CDK6 – FITC; C) DAPI; D) Sobreposição de imagens – 200x; E) Sobreposição de imagens – 400X.



Prancha XVIII. Fotomicrografia representando dupla marcação de células insulino+ e CDK6+ em ilhota pancreática de camundongos NOD. As setas apontam para a imunomarcação. Aumento de 200x - Barra=10μm; Aumento de 400x – Barra=10μm. A) Insulina – Texas Red; B) CDK6 – FITC; C) DAPI; D) Sobreposição de imagens – 200x; E) Sobreposição de imagens – 400X.

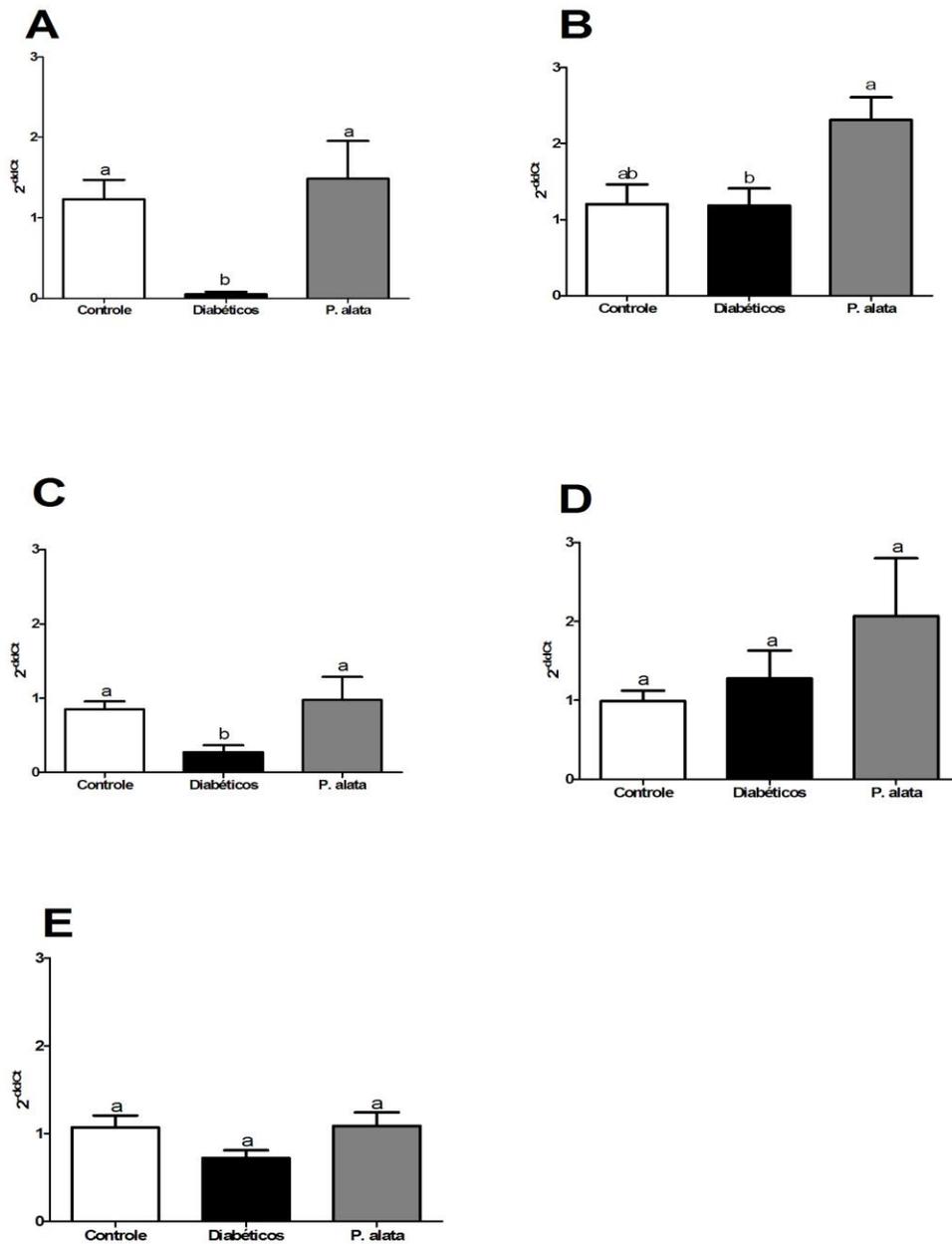


Figura 24. Gráfico representativo da expressão gênica por PCR-Tempo Real de ilhotas isoladas dos grupos controle; diabético e NOD *P.alata* não diabético. A) Insulina (a/b: $p < 0,01$); B) GLP-1 (a/b: $p < 0,05$); C) Neuro-D (a/b: $p < 0,05$); D) NGN3 (marcador estatístico “a”); E) PDX-1 (marcador estatístico “a”). Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns)

5.13. Expressão gênica - CDKs 1, 2, 4 e 6

As curvas tiveram eficiência de 99 a 101% e estão demonstradas no anexo. Foram realizadas as quantificações relativas dos genes CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6 (figura 25, pág. 107). Para análise da expressão gênica, foi utilizada a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores referentes à média e erro nos animais do grupo controle, diabético e *P.alata* foram, respectivamente, $1,16 \pm 0,14$; $2,07 \pm 0,58$; $1,31 \pm 0,44$ para CDK1, $1,13 \pm 0,21$; $1,17 \pm 0,16$; $1,08 \pm 0,1$ para CDK2, $0,92 \pm 0,2$; $0,9 \pm 0,21$; $1,03 \pm 0,11$ para CDK4 e $0,82 \pm 0,18$; $0,73 \pm 0,21$; $0,78 \pm 0,14$ para CDK6.

5.14. Efeito do extrato aquoso de *Passiflora alata* na proliferação de linfócitos de camundongos NOD estimulados *in vitro*

Linfócitos T de camundongos NOD foram submetidos a ensaios de proliferação celular por 72hs. Às culturas de células adicionava-se mitógeno concanavalina A para indução de proliferação seguida de concentrações diferentes (5, 10, 20, 50 e 100 ng/mL) do extrato aquoso de *P. Alata*. Os resultados mostraram histogramas representando a porcentagem de células em proliferação (CSFelow) nos diferentes grupos (figura 26, pág. 108) e que nas concentrações 20 μ g/mL, 50 μ g/mL e de 100 μ g/mL ocorreu redução significativa ($p < 0,001$) na porcentagem das células T em proliferação nas doses de após 72h de estimulação com o mitógeno, quando comparados com o grupo controle (C+) (figura 26B, pág. 108). Observamos também redução significativa do índice de proliferação nos grupos tratados com as doses de 50 μ g/mL e de 100 μ g/mL do extrato aquoso, quando comparados com o grupo controle (C+) (figura 26C, pág. 108). Provavelmente as diferenças na redução entre o índice de proliferação e porcentagem de células em proliferação reflitam as diferenças entre os momentos do estado de divisão celular.

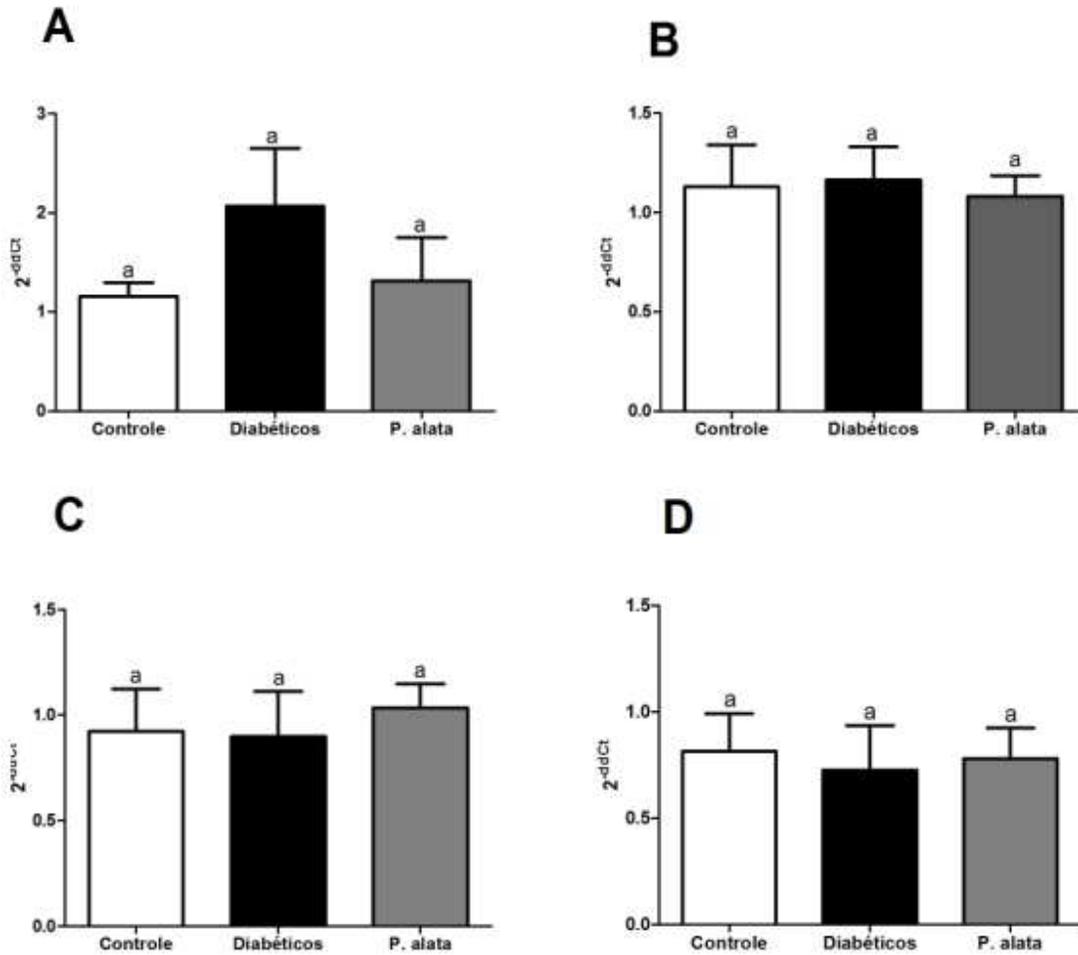


Figura 25: Gráfico representativo da expressão gênica de ilhotas isoladas dos grupos controle; diabético e NOD *P.alata* não diabético. A) CDK1; B) CDK2; C) CDK4; D) CDK6. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, com marcador estatístico "a".

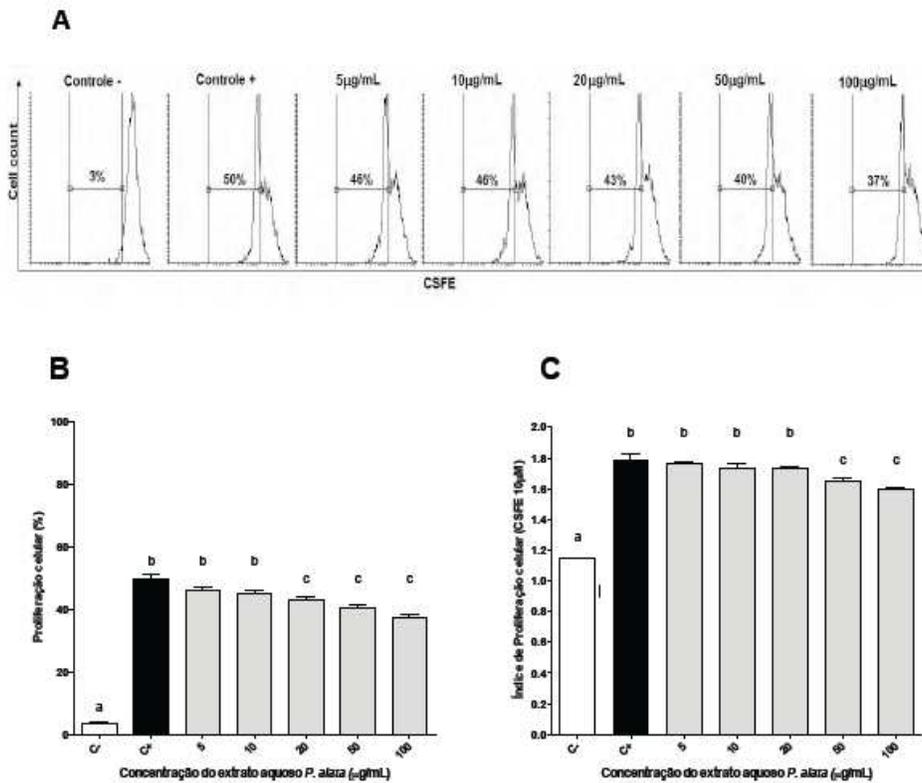


Figura 26. Ensaio de linfoproliferação de linfócitos T esplênicos na presença de extrato aquoso de *P. alata*; A) – Histogramas representando a porcentagem de células em proliferação (CSFE_{low}) nos grupos: Controle – (ausência de ConA), Controle + (2,5µg/mL ConA) , e adicionado 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL de extrato aquoso de *P.alata* na presença de 2,5µg/mL ConA; B) – As barras representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) da porcentagem de células em proliferação (CSFE_{low}), nos grupos descritos anteriormente; C) - As barras representam a média ± E.P.M. do índice de proliferação, nos grupos descritos anteriormente. A, b, c representam marcadores de diferenças estatísticas. B) a/b; a/c; b/c p<0,0001; C) a/b; a/c p<0.0001; b/c p= 0.0038. Teste t não paramétrico Mann-Whitney.



6. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, camundongos NOD, linhagem que desenvolve o diabetes autoimune espontaneamente, foram submetidos ao tratamento com extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata* Curtis por 28 semanas. Recentemente, trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa relatou que o extrato aquoso quando submetido à elevada temperatura, é capaz de extrair componentes importantes no processo antiinflamatório que são capazes de promover a diminuição de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas e reduzir, conseqüentemente, a incidência do diabetes nesta linhagem de camundongos (89).

Estudo realizado por Zunino, *et al* (2007) verificaram diminuição do desenvolvimento do diabetes tipo 1 em camundongos NOD tratados com pó de uva 1% por 28 semanas (grupo controle 71%, grupo tratado 33% incidência) (90). Adicionalmente, foi observado redução do diabetes tipo 1 em camundongos NOD tratados com flavonóide epigallocatequina galato (sintético 0,05 %). O grupo tratado apresentou incidência de 25% enquanto o grupo controle apresentou 66,7% de camundongos diabéticos ao final de 32 semanas (91).

A administração de genisteína e/ou daidzeína (sintéticos 0,02g/kg) na dieta de camundongos NOD por 9 semanas promoveu diminuição da incidência do diabetes tipo 1, apresentando taxa de sobrevivência de 50% no grupo controle e 80% nos grupos tratados, bem como alteração hepática de glicose e metabolismo de lipídeos ocasionada provavelmente pelo aumento da secreção de insulina e preservação de células beta (92). Apesar destes protocolos não serem similares aos nossos devido ao nosso método de extração dos compostos fenólicos, os resultados mostram que polifenóis podem atuar na redução da expressão do diabetes tipo 1 NOD modelo animal.

Assim, em consonância com a literatura citada acima, obtivemos diminuição na incidência do diabetes após administração de polifenóis em camundongos NOD, onde

63,3% dos camundongos NOD controle apresentaram diabetes contra 38% dos animais tratados, constatando diferença de 25,3% na expressão do diabetes, o que pode ser representação de subpopulação mais susceptível ao tratamento, o que poderia ser comparado aos diferentes genótipos de resposta ao tratamento na doença humana. Contudo, não descartamos a possibilidade dose dependente dos efeitos sobre o diabetes.

Em relação à morfologia e classificação das ilhotas segundo o grau de infiltrado celular, os resultados obtidos mostram que os animais do grupo *P.alata* apresentam número mais elevado de ilhotas de grau 2 ao passo que nos animais do grupo controle o grau mais identificado nas ilhotas é o 3. O grupo diabético apresenta, em sua maioria, ilhotas de graus 2, 3 e 4. A classificação das ilhotas quanto ao índice de insulite não apresentou diferença estatística entre os grupos, embora o grupo tratado tenha apresentado menor índice de infiltrado quando comparado aos demais grupos, demonstrando tendência à diminuição do infiltrado de células da resposta imune nas ilhotas pancreáticas dos camundongos NOD tratados com *P.alata*.

Menor grau de insulite foi observado em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD tratados com pó de uva 1% ($p < 0,05$). Os autores atribuíram este resultado a elevada atividade antioxidante da fruta; o que pode ter favorecido a proteção de células β de danos oxidativos causados pela ativação de linfócitos T e macrófagos (90). Foi constatado aumento significativo nos níveis de insulina no plasma de camundongos NOD tratados com epigallocatequina galato (0,05% em água), embora o tratamento não tenha modulado a insulite nestes animais, tendo sido observada elevação dos níveis da citocina antiinflamatória IL-10. Diante dos resultados, os autores sugerem que o efeito da epigallocatequina galato no diabetes tipo 1 pode ser mediado pela estimulação da produção de IL-10 (91).

Os dados obtidos referentes à incidência da doença, grau de infiltrado e índice de insulite corroboram com nossa hipótese de trabalho, uma vez que alguns flavonóides presentes nas folhas de *P.alata* (15) possuem atividade antiinflamatória (93) e podem estar relacionados com a diminuição da expressão de substâncias pro inflamatórias (94) e também atuar como inibidores do ciclo celular proliferativo de células inflamatórias (48).

Além da diminuição de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas de camundongos tratados, células insulino+, identificadas por imunomarcção, foram encontradas em maior quantidade no grupo *P.alata* quando comparado aos grupos controle e diabético. O grupo *P.alata* também apresentou maior expressão gênica de insulina em comparação ao grupo diabético e quando analisados os níveis de insulina sérica, o grupo diabético foi o que apresentou menor concentração.

Com a destruição de células beta pancreáticas, há consequente diminuição da produção e secreção do hormônio insulina. O maior número de células insulino+ em ilhotas do grupo *P.alata* pode dar suporte aos resultados referentes à diminuição do infiltrado inflamatório em ilhotas do grupo tratado, já que o efeito do extrato aquoso parece estar relacionado com a preservação das ilhotas pancreáticas e, consequentemente, das células beta produtoras de insulina. Estudo realizado por Zhang, *et al* (2011) mostra os efeitos protetores do flavonóide epigallocatequina galato em células da linhagem RINm5F, produtoras de insulina, pela ação contra citocinas que induzem a morte celular (95).

Quando avaliado o teste de tolerância a glicose e curva glicêmica, os grupos BALB/c e *P.alata* mantiveram a glicemia mais baixa enquanto os grupos controle e diabético apresentaram níveis glicêmicos superiores. O teste de tolerância a glicose pode ser utilizado para verificar se camundongos submetidos à administração em concentração elevada de glicose via oral é intolerante a glicose ou diabético (79). Considerando que

camundongos BALB/c são saudáveis e não desenvolvem o diabetes e que o grupo *P.alata* não apresentou diferença estatística com este grupo, este resultado é interessante, já que os compostos presentes no chá parecem atuar na tolerância à glicose destes camundongos, fazendo com que os níveis glicêmicos permaneçam inferiores aos dos grupos controle e diabético.

A análise do infiltrado de células inflamatórias por imunomarcagem mostrou resultados favoráveis ao tratamento já que verificamos diminuição do número de células TCD4⁺, TCD8⁺ e macrófagos CD11⁺ nas ilhotas pancreáticas do grupo *P.alata*. A quantidade de células CD4⁺ foi menor no grupo *P.alata* quando comparado aos outros grupos. Em relação ao número de células marcadas de TCD8, em camundongos diabéticos a marcação por TCD8⁺ foi superior ao encontrado nos grupos controle e *P.alata*, mas não apresentou diferença estatística entre os grupos. Na análise de células CD11⁺, o grupo *P.alata* apresentou menor número de células no infiltrado celular quando comparado aos grupos controle e diabético.

Com relação à análise dos diferentes graus de infiltrado de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e macrófagos CD11⁺ nas ilhotas pancreáticas, verificamos que o grupo *P.alata* possui ilhotas de grau 0 nos três tipos celulares analisados, ao passo que ilhotas de grau 4 são identificadas em camundongos diabéticos nas três análises e também em camundongos controle para TCD4 e TCD8. O grupo controle não apresentou grau 0 quando analisados os linfócitos TCD4. Visto que o grupo *P.alata* foi o único a apresentar ilhotas de grau 0 e não apresentar ilhotas de grau 4 nos três tipos celulares analisados, os efeitos do extrato aquoso de *P.alata* parece, então, atuar na expressão de TCD4, TCD8 e CD11, diminuindo o infiltrado dessas células nas ilhotas pancreáticas. Nas três análises, as ilhotas do grupo

P.alata estavam mais preservadas que nos outros grupos, sugerindo que de alguma maneira o tratamento pode ter atuado na diminuição de expressão de células inflamatórias.

A insulite inicia-se na quarta semana de vida dos camundongos da linhagem NOD, levando a um aumento de células inflamatórias infiltrativas que desencadeiam processo de destruição das células beta pancreáticas produtoras de insulina (9). Desta forma, a diminuição de células infiltrativas em ilhotas pancreáticas dos camundongos tratados pode ter contribuído para efeito antiinflamatório nas ilhotas e consequente preservação de células beta.

Com desenvolvimento do diabetes, aumentam os mecanismos pró-inflamatórios e o estresse oxidativo no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo produzindo assim os radicais livres. Esses radicais livres apresentam elétrons desemparelhados altamente reativos que produzem as espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) (96-98).

Essas ERO e ERN estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídeos de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, levando a várias patologias (99).

Analisando o estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas, observamos que os animais do grupo *P.alata* apresentam ilhotas de grau 0 e 1 em maior quantidade quando comparado aos grupos controle e diabético, além de não apresentarem ilhotas de grau 3 e 4, como observado nos outros grupos. Desta forma, pode-se constatar que o estresse oxidativo está diminuído no grupo *P.alata* quando comparado aos demais. Na literatura há relatos de aumento nos níveis de malondialdeído plasmático, assim como diminuição de enzimas

antioxidantes em pacientes com diabetes (100-101). O estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento e progressão do diabetes e o uso de antioxidantes pode ser uma estratégia eficaz para o controle da doença (102). Os flavonóides, por possuírem propriedades antioxidantes, podem agir de forma positiva no controle do estresse oxidativo ocasionado na doença.

Apoptose, definida como morte celular programada, é uma forma coordenada de uma série de eventos que levam a morte celular. É um processo fisiológico que desempenha papel importante na manutenção e remoção de células infectadas ou que foram estimuladas pelos linfócitos T nas ilhotas pancreáticas. O desequilíbrio entre a replicação e/ou neogênese e a apoptose de células beta pode gerar o diabetes.

Apoptose de células beta pode ocorrer por diferentes fatores, como 1) morte celular induzida por citocina (103-104); 2) perturbação mitocondrial, como perda na produção de ATP na mitocôndria, liberação de proteínas ativadas por caspase e aumento na produção de superóxidos (105); e 3) estresse de retículo endoplasmático (106-107). Células beta pancreáticas são vulneráveis a esses três fatores que podem ser provocados por alterações metabólicas (glicotoxicidade e lipotoxicidade).

A análise dos resultados quanto à expressão de células apoptóticas em nosso modelo, os camundongos do grupo *P.alata* apresentaram porcentagem maior de ilhotas de grau 1 ao passo que os grupos controle e diabético apresentaram aumento de insulite grau 4. O número de células apoptóticas quando analisada área marcada/área total da ilhota foi inferior nos camundongos tratados com *P.alata* quando comparado aos outros grupos, embora não haja diferença estatística na análise.

Nossos resultados sugerem que a ação protetora do extrato aquoso nas ilhotas pancreáticas, provavelmente também relacionada a atividade antioxidante dos compostos

fenólicos presentes na folha do *P.alata*, inibem a proliferação de linfócitos T. Desta forma, é possível que as propriedades antioxidantes do extrato *P.alata*, atuando no estresse oxidativo e diminuição do infiltrado celular na ilhota, contribua com a sua preservação e manutenção dos níveis de insulina nos animais susceptíveis ao tratamento (108-109).

Células glucagon+ foram encontradas em maior quantidade do grupo diabético e em níveis inferiores no grupo controle. É possível que a destruição de células beta devido ao mecanismo inflamatório possa estimular as células alfa a produzirem glucagon para que o fígado possa quebrar o glicogênio e liberar glicose.

Assim como glucagon, células somatostatina+ foram encontradas em maior quantidade no grupo diabético e com menores níveis no grupo *P.alata*. Ludvigsen, *et al*, (2012), relatou maior expressão de receptores de somatostatina em camundongos NOD hiperglicêmicos quando comparados a NOD normoglicêmicos, provavelmente por consequência dos níveis glicêmicos elevados ou devido ao processo inflamatório no pâncreas dos camundongos (110).

O GLP-1 (glucagon like-peptide-1) é derivado do proglucagon que é liberado no pâncreas e intestino (111). É um hormônio gastrointestinal que é secretado na circulação após a ingestão de alimentos que está envolvido no retardo da entrada de glicose na corrente sanguínea, supressão da produção de glucagon e regulação da síntese e secreção de insulina, atuando também na diferenciação, proliferação e sobrevivência de células β pancreáticas. O GLP-1 pode regular o crescimento das ilhotas pancreáticas por neogênese de células β a partir de células progenitoras dos ductos pancreáticos, e por replicação. A expressão deste hormônio se relaciona também à diminuição da incidência de DM-1 e de apoptose de células beta em camundongos NOD pré-diabéticos tratados com GLP-1 humano (112).

Em nossos resultados, os níveis de expressão gênica de GLP-1 foram mais elevados no grupo *P.alata* assim como na análise por imunomarcação de células GLP-1+. Este aumento de expressão no grupo *P.alata* pode ser compreendido como uma maior preservação das ilhotas pancreáticas neste grupo. A análise por imunomarcação mostrou, ainda, número superior de células GLP-1+ em animais diabéticos, sendo similar ao encontrado no grupo *P.alata*, que pode ter ocorrido devido a um mecanismo de compensação das células beta a agressão ocorrida no processo inflamatório. Em trabalho realizado por Rydgren, *et al*, (2012) níveis elevados de GLP-1 foram identificados em soros de camundongos NOD diabéticos quando comparados aos não diabéticos, além de terem sido observados também em cortes de glândulas pancreáticas de camundongos NOD diabéticos. Os autores atribuíram este fato a diminuição de células beta e aumento de células alfa nestas ilhotas, que poderia ativar o proglucagon a produzir GLP-1 (113). Embora não tenhamos trabalhado com análise de GLP-1 em soros dos camundongos, a maior expressão do hormônio em animais diabéticos pode nos sugerir também um mecanismo compensatório à diminuição de insulina em consequência a diminuição do número de células beta.

Muito embora não tenhamos detectado imunomarcação (expressão protéica) de fatores de crescimento/regeneração, a expressão gênica de PDX-1 e NGN-3 revelou a presença destes fatores nas ilhotas pancreáticas, mas sem diferença estatística entre os grupos analisados. Neuro-D, fator de transcrição que regula a insulina, e NGN-3 não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais, mas o grupo *P.alata* apresentou maior expressão destes fatores que os demais grupos. O fator de transcrição NGN-3 é fundamental no desenvolvimento e diferenciação dos tipos celulares da linhagem endócrina pancreática (114-115). Células que expressam NGN-3 são necessárias para o

desenvolvimento da ilhota pancreática e diferenciam-se em células beta, alfa, delta e células PP (116), o que pode justificar a tendência no aumento da expressão no grupo *P. alata* devido à maior preservação de células beta e diminuição de células inflamatórias neste grupo.

A expressão gênica de PDX-1 foi menor no grupo diabético e similar nos grupos *P. alata* e controle. O PDX-1 é um fator de transcrição expresso na diferenciação inicial e transição secundária da embriogênese do pâncreas. Está envolvido no crescimento de células precursoras, expansão e diferenciação dos tecidos endócrino e exócrino do pâncreas (117). A diminuição de expressão deste fator de transcrição no grupo diabético pode ter ocorrido devido à redução no número de células beta ocasionada pelos processos que desenvolvem a doença.

Flavonóides, um dos principais constituintes das folhas do maracujá, possuem ações importantes no organismo, dentre elas capacidade antioxidante (118) podendo agir na indução à expressão de CDKs e, conseqüentemente, na interrupção da proliferação do ciclo celular de células inflamatórias, resultando na atividade anti-inflamatória (41, 51, 119).

A expressão das CDKs foi realizada com objetivo de estudar a expressão gênica e imunomarcção celular destas proteínas nas ilhotas. A expressão gênica não apresentou diferença estatística entre os grupos.

As CDKs 1 e 2 não apresentaram marcações nos animais do grupo controle e *P. alata*, mas sim no grupo diabético. Não foram encontrados relatos de expressão de CDK1 em ilhotas de camundongos. Estudo realizado por Taneera, *et al* (2013) relata a expressão de CDKs 1 a 20 em ilhotas pancreáticas de humanos, tendo sido constatadas CDKs 4, 8 e 9 com maior expressão quando comparadas as outras. A CDK18 foi relatada com maior

expressão em indivíduos com diabetes tipo 2 quando comparados a indivíduos saudáveis, embora CDK5 seja aumentada em indivíduos não diabéticos (120).

A proteína CDK4 também não foi encontrada no grupo *P.alata*, mas no grupo controle foram constatadas poucas marcações que pareciam acompanhar o infiltrado celular. Nos animais diabéticos, a CDK4, assim como as outras CDKs estudadas, também foi identificada.

A CDK4 é necessária para a proliferação de células beta pancreáticas e a ativação desta proteína pode ser uma ferramenta para tratamento do diabetes (121).

Foram identificados em pacientes com melanoma, mutação na CDK4 que resulta na substituição da arginina por cisteína na posição 24 (R24C) fazendo com que a proteína mutante CDK4 R24C não tenha mais afinidade com o inibidor p16 (122). Camundongos com esta mutação demonstraram hiperplasia pancreática devido à proliferação anormal de células β pela impossibilidade da proteína se ligar ao inibidor p16 (123). Marzo, *et al*, (2008) relata que camundongos NOD com a mesma mutação R24C, promovem hiperatividade da proteína CDK4, levando à ativação de células pró-inflamatórias e consequente comprometimento da integridade das ilhotas. Isso mostra que a expressão de CDK4 atua onde há eventos de proliferação celular e a ausência de proteínas inibitórias contribui com a proliferação de células pró-inflamatórias do sistema imune (124).

Em comparação as CDKs 2, 4 e 6, a CDK1 possui menor expressão em ilhotas de humanos. As CDKs 4 e 6 por atuarem na transição das fases G1/S, podem desempenhar uma função independente de ciclo celular devido a fosforilação de substratos essenciais para a progressão do ciclo celular (120).

A análise da CDK6+ mostrou que a marcação da proteína acompanhava o grau de insulite celular nas ilhotas pancreáticas. Para isto, as lâminas subsequentes às utilizadas

para a imunomarcação foram submetidas à coloração por HE para identificação das mesmas ilhotas observadas na imunofluorescência. As ilhotas que não apresentavam insulite, não expressavam também CDK6+.

Ainda assim, para nos certificarmos da correlação entre marcação de CDK6 e células inflamatórias, foi realizada dupla marcação com superposição de imagem por imunofluorescência indireta com os anticorpos anti-CDK6 e anti-CD8 e constatamos que as marcações apresentaram-se exatamente na mesma localização. Para finalizar, foi realizada a técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-insulina na lâmina subsequente a dupla marcação e observamos, pela análise das mesmas ilhotas, que insulina e CDK6 não apresentam correlação de marcação. Os grupos diabético e controle apresentaram maior número de células CDK6+ em ilhotas pancreáticas quando comparados ao grupo *P.alata*. Não há trabalhos na literatura que relacionem a marcação de CDK6 e camundongos NOD, apenas relatos que a proteína CDK6 não expressa em ilhotas de camundongos (54). No presente estudo verificamos a expressão de CDK6 em células inflamatórias ativadas por processos de proliferação celular em camundongos NOD.

As CDKs 4 e 6 atuam na fase G1 do ciclo celular, compartilham 71% dos aminoácidos identificados e ambas paream com as ciclinas D1, D2 e D3 (125-126). Os complexos CDK4/CiclinaD e CDK6/CiclinaD fosforilam membros família de proteína Retinoblastoma (Rb), pRB, p 107 e p130 (127). A proteína CDK6 e Ciclina D2 são as primeiras moléculas do ciclo celular a serem reguladas positivamente após ativação de células T (64).

Esta proteína é considerada um ativador da progressão do ciclo celular em muitos tipos celulares e, em humanos, a CDK6, juntamente a ciclina D1, estimulam a replicação de células beta in vitro e in vivo (57). Normalmente, a expressão de CDK6 é localizada no

citoplasma, mas estas proteínas são translocadas ao núcleo quando ativas (128). A localização nuclear de CDK6 em processos de ativação ocorre também em linfócitos T (129). Em nossos resultados, a expressão de CDK6 foi nuclear, acompanhando a marcação por DAPI. Como as células marcadas estavam em processo de proliferação, os resultados parecem pertinentes ao que foi encontrado na literatura.

A expressão de CDK6 está relacionada com a insulite no pâncreas. Como as células do sistema imune estão em proliferação celular, que é um evento característico no modelo NOD, pode-se sugerir que a expressão das quinases acompanhe os eventos de proliferação devido à ativação das células inflamatórias. Podemos sugerir, desta forma, que a não expressão de CDK6 em células beta é decorrente da ativação da proteína devido ao processo inflamatório.

Embora a expressão de inibidores de CDKs não tenha sido estudada, há trabalhos na literatura que relacionam a interrupção do ciclo celular de células proliferativas com ação de flavonóides que podem induzir a expressão de CDKis, tais como p21 e p27, inibindo efeitos proliferativos (51, 63-64, 129). A expressão de p21, inibidor de CDK pertencente à família CIP/KIP, modificaria a ativação e proliferação de linfócitos T e inibiria a expressão de citocinas, especialmente citocinas pró-inflamatórias, o que poderia prevenir a inflamação (130).

A proteína p27 inibe os complexos CDK2/CiclinaE, CDK2/CiclinaA, CDK4/CiclinaD e CDK6/CiclinaD, e age na interrupção do ciclo celular (70). Seus efeitos antiproliferativos podem atuar em eventos de proliferação celular (71).

Lim, *et al* (2006) realizou estudo relacionado a atividade antiproliferativa de polifenóis encontrados em diversos tipos de chá comerciais e constatou que o flavonóide epigallocatequina 3-galato, o componente mais encontrado entre os polifenóis do chá verde,

tiveram citotoxicidade seletiva em células tumorais e, além disso, estas células estavam mais sensíveis a este tratamento que as células normais (28).

Yang, *et al* (2009) verificaram que a expressão de p21 em células beta produtoras de insulina poderia colaborar com a recuperação de camundongos diabéticos induzidos por streptozotocina (69).

Os resultados referentes à proliferação de linfócitos T sugerem propriedades dose dependentes do extrato aquoso de *P. alata* na proliferação e ativação de linfócitos, já que nas concentrações 20µg/mL, 50µg/mL e de 100µg/mL ocorreu redução significativa na porcentagem das células T em proliferação nas doses de após 72h de estimulação com o mitógeno. Também foi constatada redução significativa do índice de proliferação nos grupos tratados com as doses de 50µg/mL e de 100µg/mL do extrato aquoso, quando comparados com o grupo controle. Estes resultados preliminares se mostram promissores, no que se refere ao efeito dos extratos aquosos de *P.alata* na proliferação e ativação de linfócitos; dados da literatura relatam que compostos fenólicos antioxidantes, como o ácido nordihidroguaiarético (NDGA) e o hidroxianisol butilado (BHA), inibiram de maneira dose dependente a proliferação de esplenócitos e timócitos murinos estimulados por 48h com concanavalina A (130).

Na linhagem de camundongos NOD, a morte celular de células β ocorre devido à ação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (131). De acordo com os resultados encontrados neste estudo, os compostos flavonóides do maracujá parecem agir na interrupção da proliferação celular de células envolvidas no processo inflamatório, por meio da inibição ocasionada no ciclo celular destas células.

Visto que alguns trabalhos associam a expressão de inibidores de CDK com eventos celulares não proliferativos, e que a expressão das CDKs em células T é evidente em

proliferação celular, os resultados obtidos neste estudo sugerem que os flavonóides encontrados nas folhas de *P. alata* podem ter contribuído nos mecanismos modulatórios da expressão de CDKs, mais especificamente na CDK6, podendo ter agido na interrupção do ciclo celular de células inflamatórias e, conseqüentemente, na migração e/ou proliferação destas células contribuindo na preservação de células beta pancreáticas de camundongos tratados.



7. CONCLUSÃO

1) Os animais tratados com extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata* Curtis apresentaram redução de 25,3% no diabetes quando comparados aos animais do grupo controle. A menor incidência da doença em animais tratados é resultado dos efeitos antiinflamatórios e antiproliferativos nas ilhotas pancreáticas destes animais.

2) Quando analisados os graus de lesão em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD tratados, tanto pela histologia quanto pela imunofenotipificação, verificamos que estas ilhotas estavam mais conservadas que as dos grupos controle e diabético. Isto ocorre devido à menor quantidade de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e macrófagos CD11⁺ presentes em ilhotas pancreáticas do grupo tratado, o que ocasionou efeito antiinflamatório e maior conservação das ilhotas pancreáticas.

3) Células CDK6⁺ foram encontradas em menor quantidade nos animais *P.alata* e mais expressas em animais controle e diabéticos, o que pode nos sugerir que os flavonóides tenham atuado no ciclo celular e, conseqüentemente, na interrupção da proliferação celular de células inflamatórias ativadas, propiciando controle da inflamação.



8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento dos camundongos NOD com o extrato aquoso das folhas secas de *Passiflora alata* apresentou resultados promissores, reduzindo a incidência do diabetes, diminuindo o infiltrado celular e estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas, além de reduzir também o número de células CDK6+, que expressam em populações do infiltrado inflamatório, podendo ter contribuído com a interrupção do ciclo celular de células inflamatórias ativadas. Além destes resultados, a maior número de células insulino+ em ilhotas pancreáticas do grupo tratado pode sugerir, além de diminuição do processo inflamatório, conservação de células beta pancreáticas produtoras de insulina. Estes resultados podem representar as propriedades antiinflamatórias e antiproliferativas dos compostos presentes nas folhas de *P. alata* e sugerem que os compostos presentes nas folhas possuam ação importante no controle da inflamação ocasionada no diabetes tipo 1 favorecendo, desta forma, a preservação de células beta pancreáticas e consequente manutenção dos níveis de insulina. Entretanto, a diminuição da proliferação celular de linfócitos na presença de diferentes concentrações de *P. alata* mostrou que estudos de dose/efeito são essenciais para consolidação de suas propriedades e possível transposição para estudos clínicos.



9. REFERÊNCIAS

1. Wasserfall CH, Atkinson MA. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 2006 Jul;5(6):424-8.
2. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest.* 2001 Nov;108(9):1247-52.
3. Abbas AKL LA, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular.* 2007.
4. Seissler J SW. Are we ready to predict and prevent endocrine/organ specific autoimmune diseases? *Springer Semin Immunopathol.* 2002;24:273-95.
5. Nagata M, Santamaria P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon JW. Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1994 Feb 15;152(4):2042-50.
6. Eizirik D L M-PT. A choice of death-the-signal-transduction of immune-mediated beta- cell apoptosis. *Diabetologia.* 2001;44(12):2115-33.
7. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 1980 Jan;29(1):1-13.
8. Pavin EJ Z, RL. Implantação da linhagem NOD mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo de diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. *ArqBras Endocrinologia & Metabologia.* 1994;38:105-8.
9. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447-85.
10. Wong FS, Janeway CA, Jr. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol.* 1997 Jun;148(5):327-32.
11. Janebro DI QM, Ramos AT, Sabaa-Srur AUO, Cunha MAL, Diniz, MFFM. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.*) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. *Revista Brasileira de Farmacologia.* 2008;2008(18):724-32.
12. Mead MN. Nutrigenomics: the genome--food interface. *Environ Health Perspect.* 2007 Dec;115(12):A582-9.
13. Bernacci LC ML, Soares-Scott MD, da Silva Passos IR. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. *Embrapa Cerrados.* 2005;22:559-86.
14. Faleiro FG JN, Braga MF, Oliveira EJ, Peixoto JR, Costa AM. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - desafios da pesquisa. *Embrapa Cerrados.* 2004;1(18):187-210.
15. Dhawan K, Dhawan, S, Sharma, A. *Passiflora*: a review update. *Journal of ethnopharmacology.* 2004;94:1-23.
16. *Farmacopeia Brasileira.* 2010;2:546.
17. Kaur C KH. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Journal of food Science and Technology.* 2002;2002(37):153-61.
18. Martinez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. [Nutritional importance of phenolic compounds in the diet]. *Arch Latinoam Nutr.* 2000 Mar;50(1):5-18.
19. Petry RD, Reginatto F, de-Paris F, Gosmann G, Salgueiro JB, Quevedo J, et al. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytother Res.* 2001 Mar;15(2):162-4.
20. Pereira CA, Yariwake JH, Lancas FM, Wauters JN, Tits M, Angenot L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochem Anal.* 2004 Jul-Aug;15(4):241-8.
21. Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C, et al. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem Anal.* 2012 May-Jun;23(3):232-9.
22. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2001 Jan;107(2):135-42.

23. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Nov;26(5):343-56.
24. Garcya-Lafuente A GE, Rostagno MA, Martynez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res, Basel*. 2009;58:537-52.
25. Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY, et al. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases andNF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem*. 2003 Jan;243(1-2):153-60.
26. Liu J, Li X, Yue Y, Li J, He T, He Y. The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell Mol Immunol*. 2005 Dec;2(6):455-60.
27. Jackson JK, Higo T, Hunter WL, Burt HM. The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflamm Res*. 2006 Apr;55(4):168-75.
28. Lim YC, Lee SH, Song MH, Yamaguchi K, Yoon JH, Choi EC, et al. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. *Eur J Cancer*. 2006 Dec;42(18):3260-6.
29. Nishikawa T, Nakajima T, Moriguchi M, Jo M, Sekoguchi S, Ishii M, et al. A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *J Hepatol*. 2006 Jun;44(6):1074-82.
30. Kim DI, Lee SJ, Lee SB, Park K, Kim WJ, Moon SK. Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression. *Carcinogenesis*. 2008 Sep;29(9):1701-9.
31. Lee EJ, Moon GS, Choi WS, Kim WJ, Moon SK. Naringin-induced p21WAF1-mediated G(1)-phase cell cycle arrest via activation of the Ras/Raf/ERK signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Food Chem Toxicol*. 2008 Dec;46(12):3800-7.
32. Lin JP, Yang JS, Lin JJ, Lai KC, Lu HF, Ma CY, et al. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environ Toxicol*. 2012 Aug;27(8):480-4.
33. Cai X, Ye T, Liu C, Lu W, Lu M, Zhang J, et al. Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. *Toxicol In Vitro*. 2011 Oct;25(7):1385-91.
34. Tsui KH, Chung LC, Feng TH, Chang PL, Juang HH. Upregulation of prostate-derived Ets factor by luteolin causes inhibition of cell proliferation and cell invasion in prostate carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2012 Jun 15;130(12):2812-23.
35. Zhao Y, Yang G, Ren D, Zhang X, Yin Q, Sun X. Luteolin suppresses growth and migration of human lung cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2011 Feb;38(2):1115-9.
36. Hyun JW, Chung HS. Cyanidin and Malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G(2)/M phase and induction of apoptosis. *J Agric Food Chem*. 2004 Apr 21;52(8):2213-7.
37. Shukla S, Gupta S. Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther*. 2006 Apr;5(4):843-52.
38. Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle*. 2007 May 2;6(9):1102-14.
39. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005 Nov;30(11):630-41.
40. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501-12.
41. Schwartz GK. CDK inhibitors: cell cycle arrest versus apoptosis. *Cell Cycle*. 2002 Mar-Apr;1(2):122-3.
42. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol*. 2001 May 15;61(10):1205-15.

43. Zapata-Torres G, Opazo F, Salgado C, Munoz JP, Krautwurst H, Mascayano C, et al. Effects of natural flavones and flavonols on the kinase activity of Cdk5. *J Nat Prod.* 2004 Mar;67(3):416-20.
44. Lodish H BA, Zipursky SL. et al. . *Molecular Cell Biology.* 4th edition. New York: W. H. Freeman: 2000. Section 13.6, Cell Cycle Control in Mammalian Cells. Available from: <http://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21497>.
45. Leitch AE, Haslett C, Rossi AG. Cyclin-dependent kinase inhibitor drugs as potential novel anti-inflammatory and pro-resolution agents. *Br J Pharmacol.* 2009 Oct;158(4):1004-16.
46. Han IS, Seo TB, Kim KH, Yoon JH, Yoon SJ, Namgung U. Cdc2-mediated Schwann cell migration during peripheral nerve regeneration. *J Cell Sci.* 2007 Jan 15;120(Pt 2):246-55.
47. Golsteyn RM. Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle. *Cancer Lett.* 2005 Jan 20;217(2):129-38.
48. Khanna AK PM, Nilakantam V, Pieper GM. Recombinant p21 protein inhibits lymphocyte proliferation and transcription factors. *J Immunol.* 2005;15(174):7610-10.
49. Bagui TK, Jackson RJ, Agrawal D, Pledger WJ. Analysis of cyclin D3-cdk4 complexes in fibroblasts expressing and lacking p27(kip1) and p21(cip1). *Mol Cell Biol.* 2000 Dec;20(23):8748-57.
50. Fuster JJ, Fernandez P, Gonzalez-Navarro H, Silvestre C, Nabah YN, Andres V. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc Res.* 2010 May 1;86(2):254-64.
51. Pan MH CW, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2002;23(10):1677-84.
52. Yu-Li Lin I-MJ, Ying-Ling Chen, Yu-Chih Liang, Jen-Kun Lin. Composition of Polyphenols in Fresh Tea Leaves and Associations of Their Oxygen-Radical-Absorbing Capacity with Antiproliferative Actions in Fibroblast *J Agric Food Chem.* 1986;44:1387-94.
53. Lee DH, Park KI, Park HS, Kang SR, Nagappan A, Kim JA, et al. Flavonoids Isolated from Korea Citrus aurantium L. Induce G2/M Phase Arrest and Apoptosis in Human Gastric Cancer AGS Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:515901.
54. Cozar-Castellano I, Fiaschi-Taesch N, Bigatel TA, Takane KK, Garcia-Ocana A, Vasavada R, et al. Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic beta-cell. *Endocr Rev.* 2006 Jun;27(4):356-70.
55. Cozar-Castellano I, Weinstock M, Haught M, Velazquez-Garcia S, Sipula D, Stewart AF. Evaluation of beta-cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen: comprehensive characterization of the G1/S regulatory proteins reveals unique involvement of p21cip. *Diabetes.* 2006 Jan;55(1):70-7.
56. Hinault C, Hu J, Maier BF, Mirmira RG, Kulkarni RN. Differential expression of cell cycle proteins during ageing of pancreatic islet cells. *Diabetes Obes Metab.* 2008 Nov;10 Suppl 4:136-46.
57. Fiaschi-Taesch N, Bigatel TA, Sicari B, Takane KK, Salim F, Velazquez-Garcia S, et al. Survey of the human pancreatic beta-cell G1/S proteome reveals a potential therapeutic role for cdk-6 and cyclin D1 in enhancing human beta-cell replication and function in vivo. *Diabetes.* 2009 Apr;58(4):882-93.
58. Martin J, Hunt SL, Dubus P, Sotillo R, Nehme-Pelluard F, Magnuson MA, et al. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene.* 2003 Aug 14;22(34):5261-9.
59. Cozar-Castellano I, Takane KK, Bottino R, Balamurugan AN, Stewart AF. Induction of beta-cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1. *Diabetes.* 2004 Jan;53(1):149-59.

60. Lavine JA, Raess PW, Davis DB, Rabaglia ME, Presley BK, Keller MP, et al. Contamination with E1A-positive wild-type adenovirus accounts for species-specific stimulation of islet cell proliferation by CCK: a cautionary note. *Mol Endocrinol*. 2010 Feb;24(2):464-7.
61. Kushner JA, Ciemerych MA, Sicinska E, Wartschow LM, Teta M, Long SY, et al. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol Cell Biol*. 2005 May;25(9):3752-62.
62. Georgia S, Bhushan A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest*. 2004 Oct;114(7):963-8.
63. Liu L, Schwartz B, Tsubota Y, Raines E, Kiyokawa H, Yonekawa K, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors block leukocyte adhesion and migration. *J Immunol*. 2008 Feb 1;180(3):1808-17.
64. Lucas JJ, Szepesi A, Modiano JF, Domenico J, Gelfand EW. Regulation of synthesis and activity of the PLSTIRE protein (cyclin-dependent kinase 6 (cdk6)), a major cyclin D-associated cdk4 homologue in normal human T lymphocytes. *J Immunol*. 1995 Jun 15;154(12):6275-84.
65. Kobayashi T, Nakata T, Kuzumaki T. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Lett*. 2002 Feb 8;176(1):17-23.
66. Tyagi A, Agarwal C, Agarwal R. The cancer preventive flavonoid silibinin causes hypophosphorylation of Rb/p107 and Rb2/p130 via modulation of cell cycle regulators in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cell Cycle*. 2002 Mar-Apr;1(2):137-42.
67. Traganos F, Ardel T, Halko N, Bruno S, Darzynkiewicz Z. Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res*. 1992 Nov 15;52(22):6200-8.
68. Scatizzi JC, Mavers M, Hutcheson J, Young B, Shi B, Pope RM, et al. The CDK domain of p21 is a suppressor of IL-1beta-mediated inflammation in activated macrophages. *Eur J Immunol*. 2009 Mar;39(3):820-5.
69. Yang J, Zhang W, Jiang W, Sun X, Han Y, Ding M, et al. P21cip-overexpression in the mouse beta cells leads to the improved recovery from streptozotocin-induced diabetes. *PLoS One*. 2009;4(12):e8344.
70. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*. 1996 May 31;85(5):733-44.
71. Ophascharoensuk V, Fero ML, Hughes J, Roberts JM, Shankland SJ. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 safeguards against inflammatory injury. *Nat Med*. 1998 May;4(5):575-80.
72. Ballesteros-Tato AA, CF. Balomenos, D. Cell cycle inhibitors in T cell tolerance and autoimmunity control. *Imunologia*. 2007;26(4):184-92.
73. Colomeu TC, Figueiredo D, Cazarin CB, Schumacher NS, Marostica MR, Jr., Meletti LM, et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *Int Immunopharmacol*. 2014 Jan;18(1):106-15.
74. Sánchez-Moreno C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*. 2002;8(121-137).
75. Brand-Williams W CM, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology International*. 1995;28:25-30.
76. Signore A, Pozzilli P, Gale EA, Andreani D, Beverley PC. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia*. 1989 May;32(5):282-9.
77. Vieira KP, de Almeida e Silva Lima Zollner AR, Malaguti C, Vilella CA, de Lima Zollner R. Ganglioside GM1 effects on the expression of nerve growth factor (NGF), Trk-A receptor, proinflammatory cytokines and on autoimmune diabetes onset in non-obese diabetic (NOD) mice. *Cytokine*. 2008 Apr;42(1):92-104.

78. Leiter EH. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 15:Unit 15 9.
79. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Dec;295(6):E1323-32.
80. Gotoh M, Maki T, Kiyozumi T, Satomi S, Monaco AP. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation*. 1985 Oct;40(4):437-8.
81. Szot GL, Koudria P, Bluestone JA. Murine pancreatic islet isolation. *J Vis Exp*. 2007(7):255.
82. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem*. 1999 May 15;270(1):41-9.
83. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
84. Henry C CV, Stout R. & Swain, SL (1980). Nylon wool adherence. In *Selected Methods in Cellular Immunology* Edited by B B Mishell & S M Shiigi San Francisco: W H Freeman 182-5.
85. Lyons AB BS, Doherty KV. . Flow cytometric analysis of cell cycle division by dilution of CFSE and related dyes. *Curr Protoc Cytom*. 2013;Chapter 9. Unit 9 11.
86. Blake SJ, Hughes TP, Lyons AB. Drug-interaction studies evaluating T-cell proliferation reveal distinct activity of dasatinib and imatinib in combination with cyclosporine A. *Exp Hematol*. 2012 Aug;40(8):612-21 e6.
87. Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Apr;928:200-11.
88. Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR J*. 2004;45(3):278-91.
89. Colomeu TC, Figueiredo D, Cazarin CB, Schumacher NS, Marostica MR, Jr., Meletti LM, et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *Int Immunopharmacol*. 2013 Nov 20;18(1):106-15.
90. Zunino SJ, Storms DH, Stephensen CB. Diets rich in polyphenols and vitamin A inhibit the development of type I autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Nutr*. 2007 May;137(5):1216-21.
91. Fu Z, Zhen W, Yuskavage J, Liu D. Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *Br J Nutr*. 2011 Apr;105(8):1218-25.
92. Choi MS, Jung UJ, Yeo J, Kim MJ, Lee MK. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008 Jan-Feb;24(1):74-81.
93. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*. 1983;32:1141-8.
94. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci*. 2004 Nov;96(3):229-45.
95. Zhang Z, Ding Y, Dai X, Wang J, Li Y. Epigallocatechin-3-gallate protects pro-inflammatory cytokine induced injuries in insulin-producing cells through the mitochondrial pathway. *Eur J Pharmacol*. 2011 Nov 16;670(1):311-6.
96. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *JNat Prod*. 2000;63(7):1035-42.
97. Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Lifescience*. 2005:1-7.
98. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Anu Rev Nutr*. 1996;16:33-50.
99. Temple NJ. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*. 2000;20(3):449-59.
100. Dominguez C RE, Gussinye M, Carrascisa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type I diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 1998;21:1736-42.

101. Ramakrishna V, Jaikhanani R. Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. *Diagn Pathol.* 2007;2:22.
102. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* 2005;4(1):5.
103. Curtin JF CT. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular Signalling.* 2003;15:983-92.
104. Wajant H. The fas signaling pathway: more than a paradigm *Science.* 2002;296:1635-6.
105. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.
106. Ferri KF KG. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology.* 2001;3:E255-E63.
107. Schroder M KR. Er stress and the unfolded protein response. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2005;569:29-63
108. Sasidharan S, Sumathi V, Jegathambigai NR, Latha LY. Antihyperglycaemic effects of ethanol extracts of *Carica papaya* and *Pandanus amaryfollius* leaf in streptozotocin-induced diabetic mice. *Nat Prod Res.* 2011 Dec;25(20):1982-7.
109. Babu PV, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem.* 2013 Nov;24(11):1777-89.
110. Ludvigsen E, Stridsberg M, Janson ET, Sandler S. Altered expression of somatostatin receptors in pancreatic islets from NOD mice cultured at different glucose concentrations in vitro and in islets transplanted to diabetic NOD mice in vivo. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:623472.
111. Mojsov S, Weir GC, Habener JF. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest.* 1987 Feb;79(2):616-9.
112. Zhang J, Tokui Y, Yamagata K, Kozawa J, Sayama K, Iwahashi H, et al. Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2007 Sep;50(9):1900-9.
113. Rydgren T, Borjesson A, Carlsson A, Sandler S. Elevated glucagon-like peptide-1 plasma levels, as a possible adaptive response, in diabetic NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jul 6;423(3):583-7.
114. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development.* 2002 May;129(10):2447-57.
115. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, et al. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development.* 2000 Aug;127(16):3533-42.
116. Desgraz R, Herrera PL. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development.* 2009 Nov;136(21):3567-74.
117. Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development.* 1995 Jun;121(6):1569-80.
118. Velioglu YS MG, Gao L, Oomah BD. . Antioxidant activity and total phenolics in selected fruit, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem.* 1998;46(10):4113-7.
119. Zi X, Grasso AW, Kung HJ, Agarwal R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Res.* 1998 May 1;58(9):1920-9.
120. Taneera J, Fadista J, Ahlqvist E, Zhang M, Wierup N, Renstrom E, et al. Expression profiling of cell cycle genes in human pancreatic islets with and without type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Aug 15;375(1-2):35-42.
121. Hino S, Yamaoka T, Yamashita Y, Yamada T, Hata J, Itakura M. In vivo proliferation of differentiated pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependent kinase 4. *Diabetologia.* 2004 Oct;47(10):1819-30.

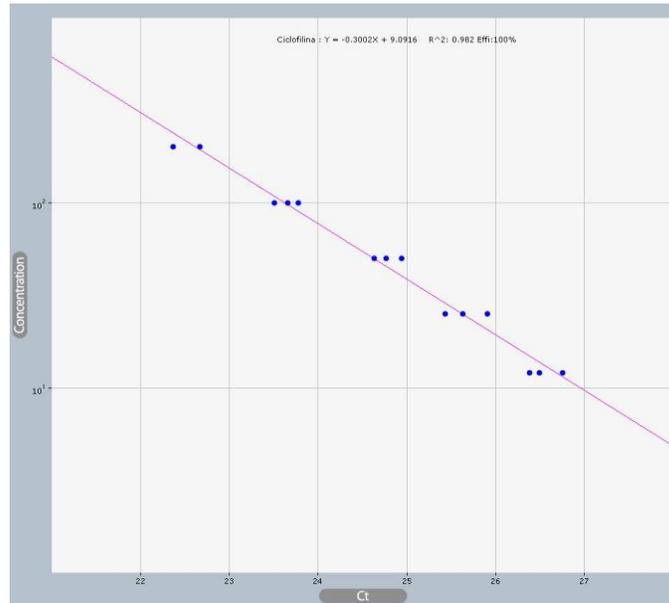
122. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.* 1996 Jan;12(1):97-9.
123. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, et al. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet.* 1999 May;22(1):44-52.
124. Marzo N, Ortega S, Stratmann T, Garcia A, Rios M, Gimenez A, et al. Cyclin-dependent kinase 4 hyperactivity promotes autoreactivity in the immune system but protects pancreatic cell mass from autoimmune destruction in the nonobese diabetic mouse model. *J Immunol.* 2008 Jan 15;180(2):1189-98.
125. Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, et al. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* 1992 Aug;11(8):2909-17.
126. Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol.* 1994 Mar;14(3):2077-86.
127. Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell.* 2004 Aug 20;118(4):493-504.
128. Fiaschi-Taesch NM, Salim F, Kleinberger J, Troxell R, Cozar-Castellano I, Selk K, et al. Induction of human beta-cell proliferation and engraftment using a single G1/S regulatory molecule, cdk6. *Diabetes.* 2010 Aug;59(8):1926-36.
129. Mahony D, Parry DA, Lees E. Active cdk6 complexes are predominantly nuclear and represent only a minority of the cdk6 in T cells. *Oncogene.* 1998 Feb 5;16(5):603-11.
130. Dornand J, Gerber M. Inhibition of murine T-cell responses by anti-oxidants: the targets of lipo-oxygenase pathway inhibitors. *Immunology.* 1989 Nov;68(3):384-91.
131. Green EA, Flavell RA. The initiation of autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol.* 1999 Dec;11(6):663-9.



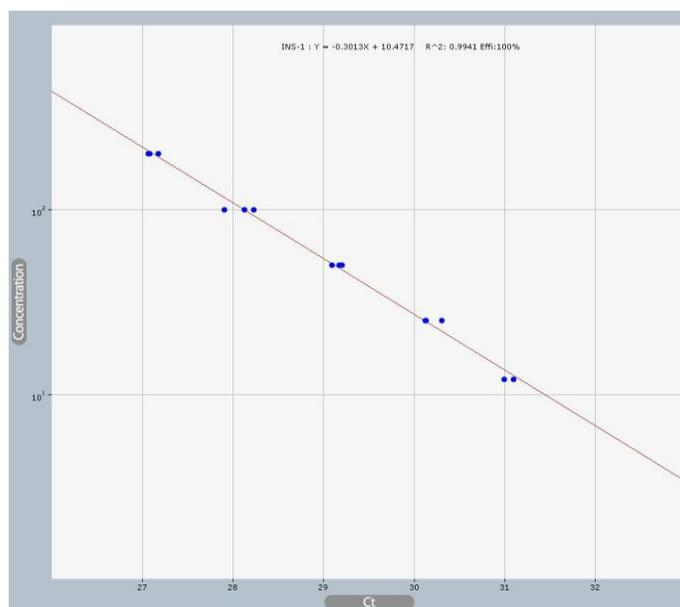
10. ANEXOS

Gráficos representativos das Curvas de Eficiência Gênica em PCR-Tempo Real dos Primers Ciclofilina(A), Insulina(B), GLP-1(C), NEURO-D (D), NGN-3(E), PDX-1(F), CDK1(G), CDK2(H), CDK4(I), CDK6(J). Concentração de primer 300nM.

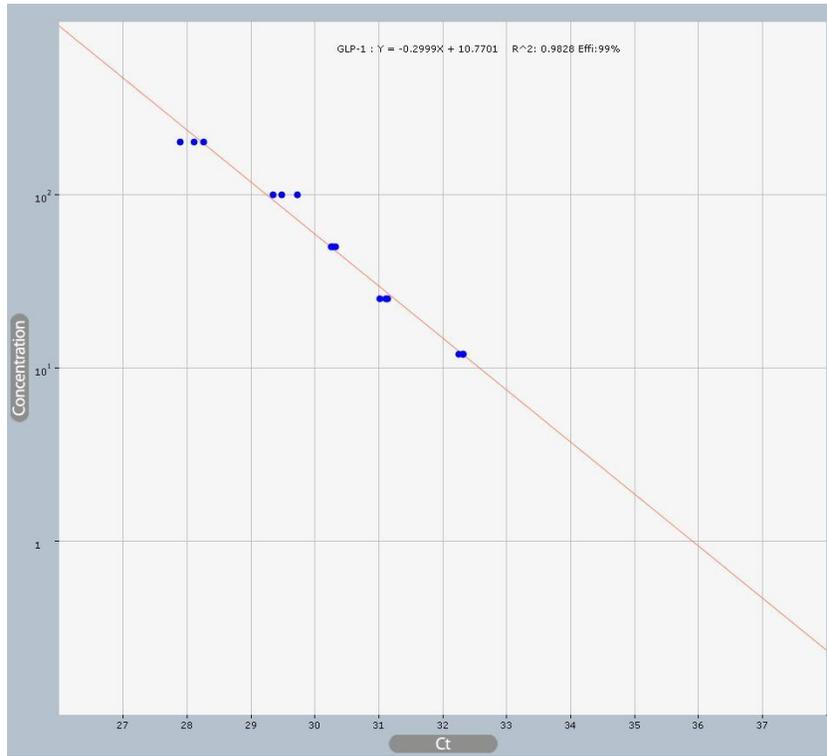
A)



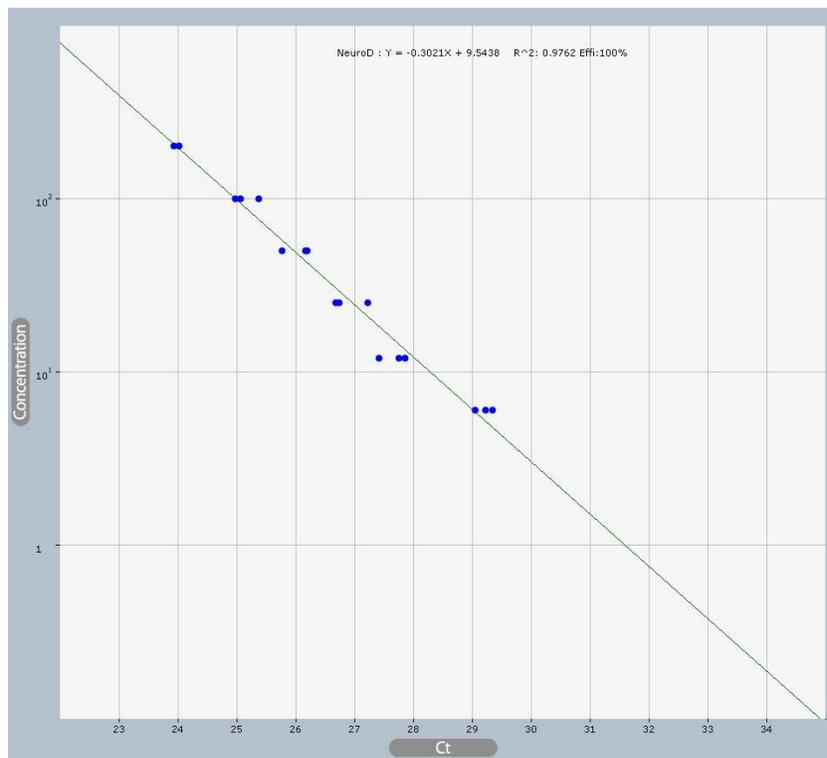
B)



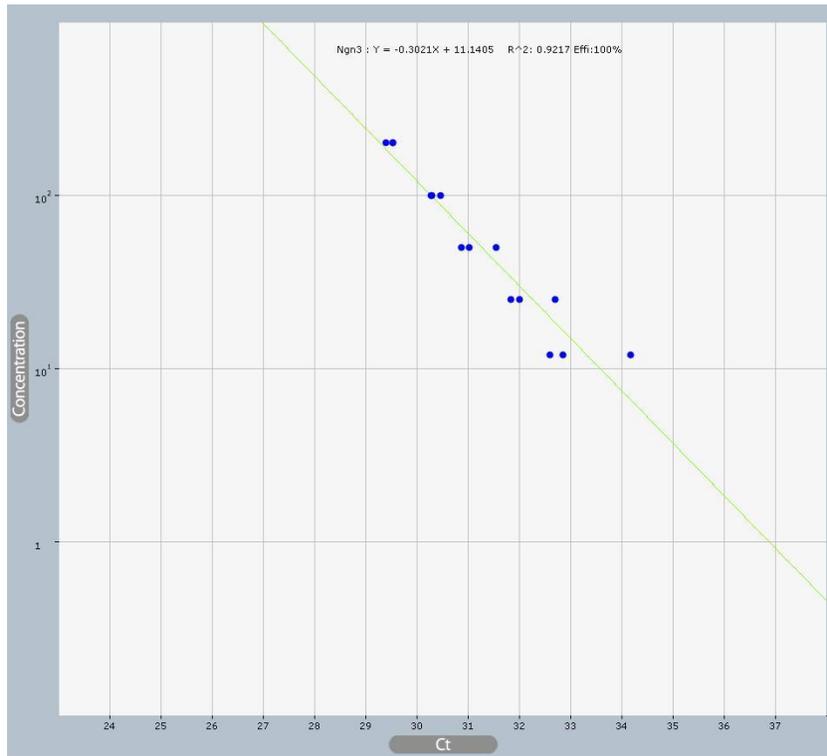
C)



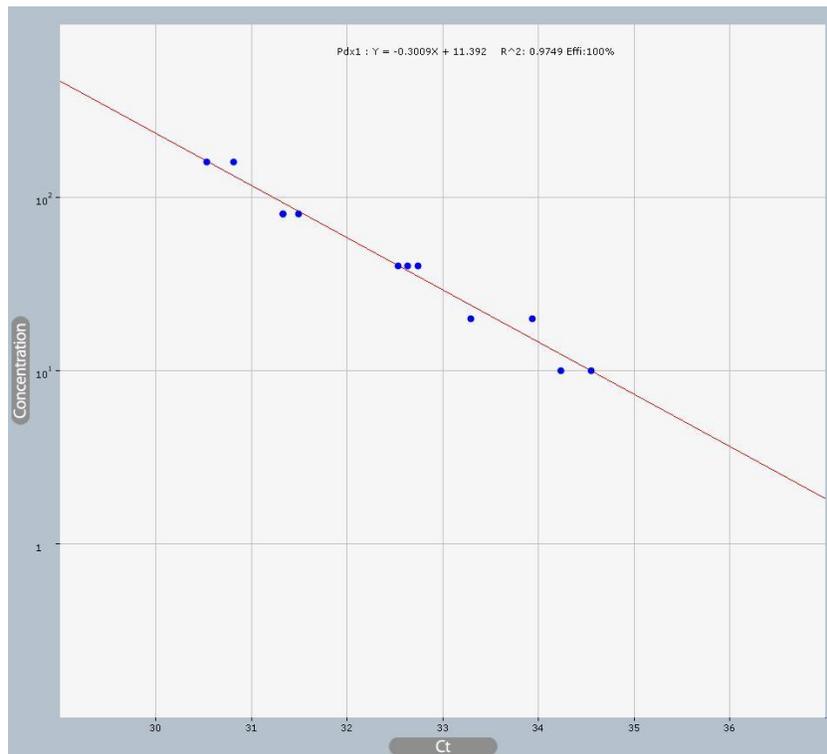
D)



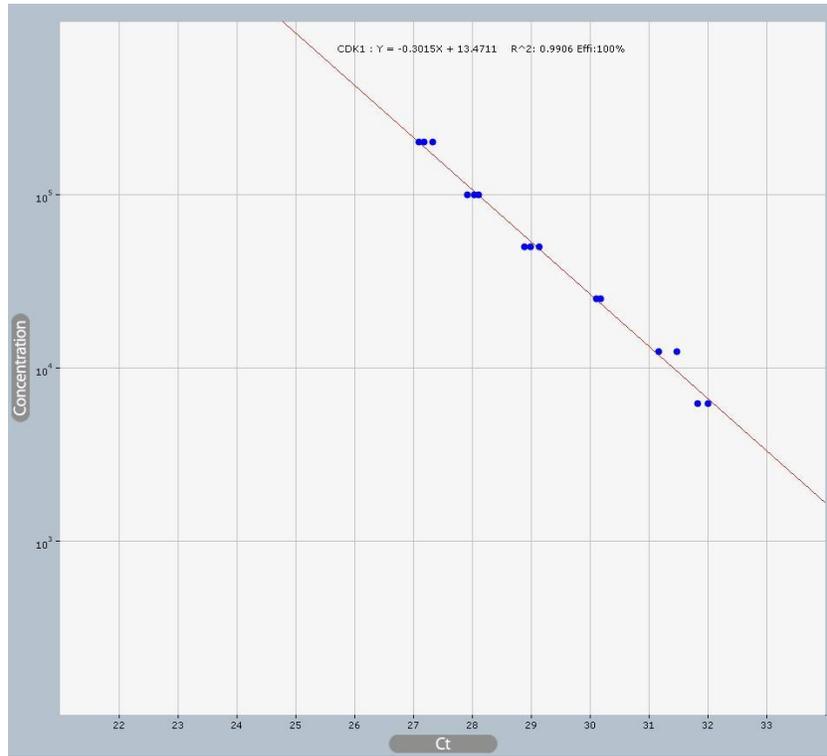
E)



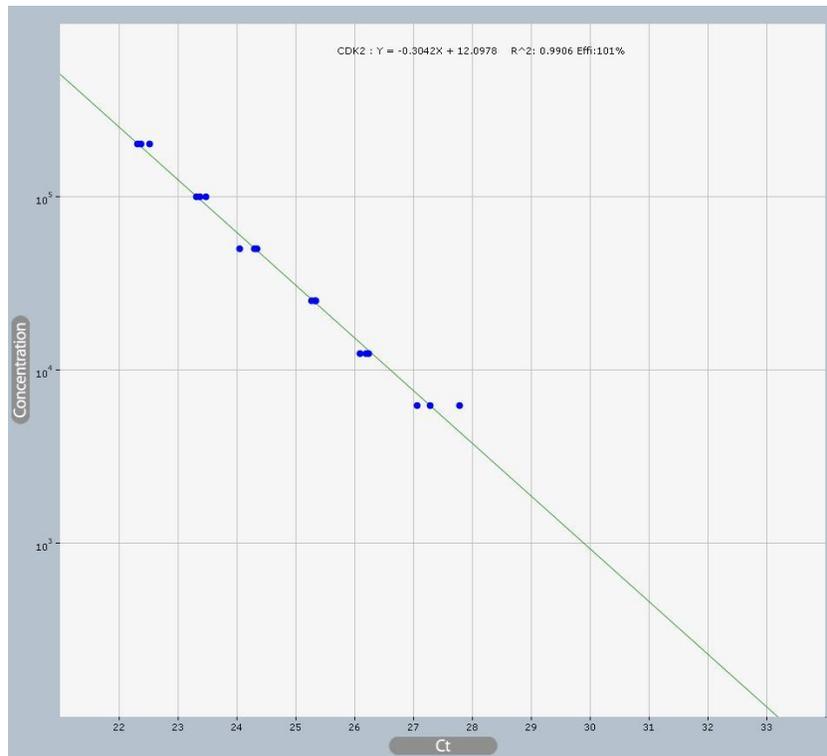
F)



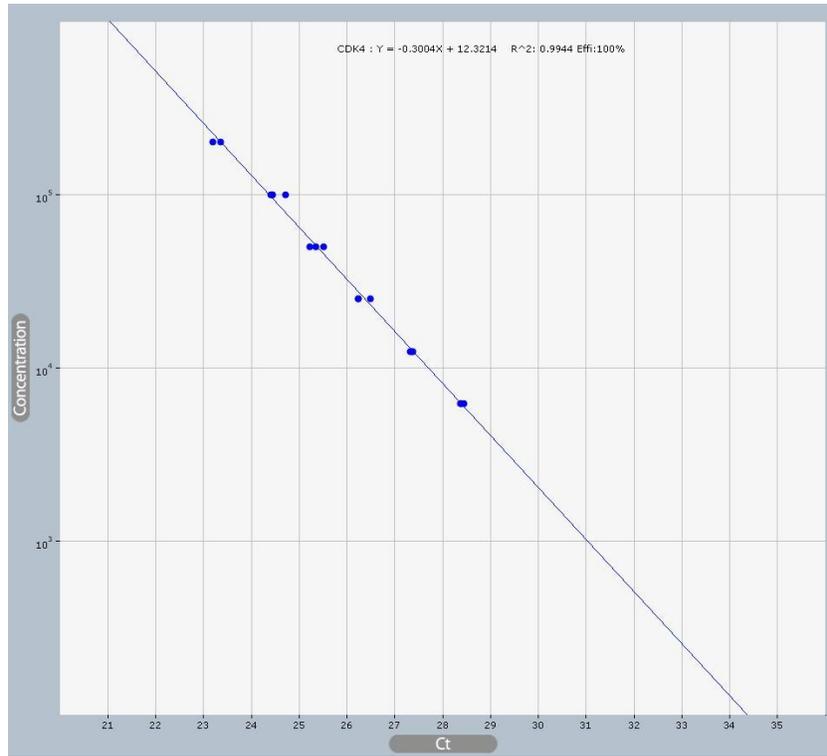
G)



H)



D)



J)

