

CARINA MALAGUTI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DIACEREÍNA NA
MODULAÇÃO DO DIABETES MELLITUS E NA
EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS
IL-1 β , TNF- α , IFN- γ E IL-12 EM ILHOTAS β
PANCREÁTICAS E CÉLULAS ESPLÊNICAS NO
CAMUNDONGO NOD (NON OBESE DIABETIC)**

CAMPINAS

2007

CARINA MALAGUTI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DIACEREÍNA NA
MODULAÇÃO DO DIABETES MELLITUS E DA
EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS
IL-1 β , TNF- α , IFN- γ E IL-12 EM ILHOTAS β
PANCREÁTICAS E CÉLULAS ESPLÊNICAS NO
CAMUNDONGO NOD (NON OBESE DIABETIC)**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M29a Malaguti, Carina
Avaliação dos efeitos da diacereína na modulação do diabetes mellitus e da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-12 em ilhotas β pancreáticas e células esplênicas no camundongo NOD (non obese diabetic) / Carina Malaguti. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

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

1. Diacereína. 2. Camundongos Endogâmicos NOD. 3. Diabetes Mellitus tipo 1. 4. Citocinas. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Evaluation of the diacerhein administration effects on modulation of Diabetes Mellitus and gene expression IL-1 β , IFN- γ , IL-12 and TNF- α in NOD mice

Keywords: • Diacerhein
• Mice, inbred NOD
• Diabetes mellitus type 1
• Citokines

Área de concentração : Ciências Básicas

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

**Banca examinadora: Prof Dr Ricardo de Lima Zollner
Profª. Dra. Paulina Sannomyia
Prof Dr Gil Guerra Júnior**

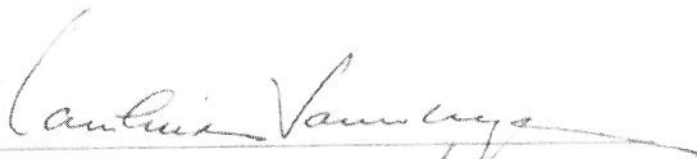
Data da defesa: 12-02-2007

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

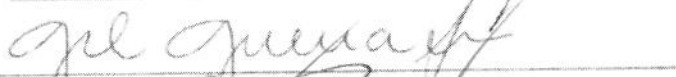
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Ricardo de Lima Zollner

Membros:

Professora Doutora Paulina Sannomiya



Professor Doutor Gil Guerra Junior



Professor Doutor Ricardo de Lima Zollner



Curso de pós-graduação Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/02/2007

DEDICATÓRIA

*Meus pais, José Maria e Zélia, irmãos Cassius, Carla,
meus cunhados Deize e Jorge e meu sobrinho Diogo.*

*Família linda, companheira, conselheira e
que sempre me apoiou.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
pelas oportunidades.*

Aos Profs. Dra. Paulina Sannomyia, Dr. Gil Guerra Junior, Dra. Gláucia Monteiro de Castro e Dra. Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann, por aceitarem compor a banca examinadora e pelas valiosas discussões e sugestões.

A ex aprimoranda Júlia pela paciência para ensinar-me procedimentos básicos do laboratório e Fabíola pela colaboração com o trabalho.

As minhas amigas Conceição e Margarida pelos ensinamentos, carinho e pelas palavras sábias nos momentos difíceis.

A Rika, Karla, Priscila, Giovanna e Thiago pela amizade, encontros diários repleto de discussões construtivas e pela cumplicidade.

A Bruna, Maira, Gláucia, Rhubia ex alunas de Pós-Graduação do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental, pela amizade, incentivo e colaboração.

Ao Leonardo pela amizade e companheirismo.

A Ana Paula Perroud pela amizade, pelas histórias engraçadas, pela ajuda em explicar algumas dúvidas clínicas e a atenção nos momentos de crises alérgicas.

A minha amiga do coração Mariana pela cumplicidade, carinho, descontração e caronas nos tempos da Faculdade.

Ao meu companheiro que me confortou nos momentos difíceis e me alegrou nos momentos de lazer.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop e Gustavo HMF Souza por permitirem e auxiliarem o uso do sistema HPLC.

Ao Prof. Dr. Gentil Alves Filho e Prof. Dr. Lício Augusto Velloso e funcionários por permitirem o uso do microscópio

A Cristiane secretária da Pós-Graduação/Departamento de Clínica Médica pela disposição e paciência.

A Renata Maia, secretária da Comissão de Pós-Graduação/FCM, pela prontidão em ajudar nos momentos difíceis.

	PÁG.
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO	16
1.1- Diabetes Mellitus	17
1.2- Camundongos NOD	19
1.3- Imunorregulação e Citocinas	21
1.4- Diacereína	23
2- OBJETIVOS	25
2.1- Objetivos Gerais	26
2.2- Objetivos Específicos	26
3- MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1- Grupos Experimentais	28
3.2- Procedimentos	28
3.2.1- Diagnóstico do Diabetes, sacrifício dos animais e extração de órgãos.....	28
3.2.2- Extração de Células Esplênicas.....	29
3.2.3- Isolamento de ilhotas.....	29
3.2.4- Detecção sérica de Diacereína por HPLC.....	30
3.2.5- Análise Morfológica.....	31
3.2.6- Fenotipificação do infiltrado inflamatório.....	32
3.2.8- Transcrição Reversa do RNA Total Extraído (cDNA).....	33

3.2.9- Amplificação do cDNA pela Transcriptase Reversa da Reação de Polimerase em Cadeia (RT-PCR).....	34
3.2.10- Análise da RT-PCR por Eletroforese em Gel de Agarose.....	35
3.2.11- Análise da expressão sérica de citocina por método imunoenzimático (ELISA).....	36
3.2.12- Análise estatística.....	37
4- RESULTADOS.....	38
4.1- Efeitos da administração de diacereína nas diferentes concentrações quanto a manifestação do diabetes e destruição das ilhotas pancreáticas.....	39
4.2- Detecção qualitativa de diacereína em soro e pâncreas por meio de HPLC.....	46
4.3- Efeitos da administração de diacereína nas diferentes concentrações sobre a expressão de citocinas em células esplênicas.....	49
4.4- Efeitos da administração de diacereína nas diferentes concentrações sobre a expressão de citocinas em ilhotas pancreáticas.....	57
4.5-Efeitos da administração de diacereína nas diferentes concentrações sobre a expressão sérica de citocinas.....	59
4.6- Imunohistoquímica.....	61
5- DISCUSSÃO.....	66
6- CONCLUSÕES.....	71
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8- ANEXO.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BB	Ratos “Bio Breeding”
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Cluster designation
cDNA	DNA complementar
CLT	Linfócito T citotóxico
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
DB	Diabético
NB	Não Diabético
DM-1	Diabetes Mellitus tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography” (Cromatografia Líquida de alta eficiência)
HE	Hematoxilina e eosina
IFN- γ	Interferon gama
I κ B	Inibidor κ B
IL	Interleucina
ICA	“Islet cell antibodies” (anticorpos anti-ilhota pancreática)
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzido
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NO	Oxido nítrico

NOD	Diabético não obeso
NK	Células “natural killer”
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAT	Ácido ribonucleico total
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa
Th1	T auxiliar/T helper 1
Th2	T auxiliar/T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UA	Unidades Arbitrárias

RESUMO

O camundongo NOD é utilizado como modelo experimental por desenvolver diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) espontâneo similar ao diabetes mellitus humano resultando na destruição das ilhotas, orquestrada pelos linfócitos T que induzem a liberação de citocinas, entre elas a IL-1, promovendo o processo inflamatório. A diacereína possui propriedades antiinflamatórias, inibindo IL-1. Entretanto, os mecanismos envolvidos na modulação imunológica ainda estão incompletamente compreendidos. No presente estudo, soro, pâncreas, ilhotas e células mononucleares esplênicas de animais tratados com diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg/dia) de diacereína e o grupo controle o qual recebeu solução salina, foram isolados para investigar a expressão de IL-1 β , IFN- γ , IL-12 e TNF- α e a relação com o início do diabetes, aspectos morfológicos e a dose-dependência da diacereína. Os resultados mostraram o aumento do RNAm de células esplênicas e ilhotas e a diminuição da concentração no soro de IL-1 em 10mg/kg/dia de diacereína, comparado com os outros grupos e aumento da concentração de IFN- γ no soro do grupo de 50mg/kg/dia. Esses resultados sugerem que a diacereína interfere na instalação do diabetes e a frequência, pela modulação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IFN- γ , IL-12 e TNF- α . Além disso, os dados sugerem regulação pós-transcricional de IL-1 β pela diacereína.

ABSTRACT

The NOD mice is used as a experimental model of spontaneously develop type1 diabetes mellitus (DM1) similar to human disease resulting in the destruction of the islet, orchestrated by T lymphocytes that induce a cytokines release, among then the IL-1, promoting inflammatory process. Diacerhein has antiinflammatory properties, inhibiting IL-1. However, the mechanisms involved in immune modulation are still incompletely understood. In the present study, serum, pancreas islets and spleen mononuclear cells from animals treated by different doses (5, 10 and 50mg/kg/day) and the group control which received solution saline, were isolated to investigate the IL-1 β , IFN- γ , IL-12 and TNF- α expression and relationship with diabetes onset, morphological aspects and diacerein dose dependence. The results demonstrate upregulation of mRNA spleen cells and islets and downregulation of serum concentration of IL-1 in 10mg/kg/day diacerein treated group compared with others groups and increase of IFN- γ serum concentration for 50 mg/kg/day group. These results suggest that the diacerhein interfere with the diabetes onset and frequency by modulation of pro-inflammatory cytokines as IL-1 β , TNF- α , IFN - γ and IL-12. Furthermore, the data suggest a post-transcriptional downregulation for IL-1 β by diacerhein.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Diabetes Mellitus

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o termo diabetes mellitus descreve desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gordura e proteína, como resultado da deficiência na produção e/ou ação da insulina[1]. Também é definida pelo nível de hiperglicemia seguida dos riscos de danos micro e macrovasculares, associada à baixa expectativa de vida, devido a complicações que podem causar acidentes vasculares, isquemia ou cardiopatias. Considerando as características etiológicas do diabetes mellitus e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, tipos específicos incluindo diabetes secundário ou associado a outras patologia e o diabetes gestacional [2].

O diabetes tipo 1 ocorre somente por volta de 5-10% de todos os casos de diabetes, entretanto, essa incidência vem crescendo em todo o mundo. As complicações micro e macrovasculares associadas ao DM-1 afetam diretamente a morbidade e/ou mortalidade dos pacientes [3]. O início do diabetes mellitus auto-imune é na maior parte das vezes agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes [4].

Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do DM-1, incluindo a destruição das células β pancreáticas acarretando a deficiência de insulina [5]. Este evento difere do observado no diabetes tipo 2, que se caracteriza pela resistência dos órgãos-alvo aos efeitos da insulina, ou seja, maior comprometimento da secreção insulínica. Em resposta a um evento iniciador, como infecção viral, observa-se resposta inflamatória contra células β das ilhotas pancreáticas. Esta inflamação se caracteriza por infiltração mononuclear progressiva das ilhotas pancreáticas e algum defeito do sistema imune, permitindo a propagação da resposta auto-imune no indivíduo predisposto geneticamente, levando à destruição das células beta, com conseqüente deficiência de insulina [5]. Outras células pancreáticas do sistema endócrino, como as produtoras de glucagon (células α) ou somatostatina (células δ) não são afetadas [6].

Diversas evidências apontam para a origem auto-imune do DM-1 [7]. Palmer [6] e Bottazzo [7] descrevem a presença de auto-anticorpos circulantes determinados anticorpos anti-célula da ilhota ou ICA (“*islet-cell antibodies*”). Os ICA são detectados precocemente antes da manifestação clínica do diabetes e são considerados marcadores imunológicos do DM-1 sem efeito patogênico direto [8].

Enfatizando-se a classificação do DM-1 como doença auto-imune e evidenciada pela destruição seletiva das células β das ilhotas pancreáticas pela presença de clones auto-reativos de linfócitos T, pode-se presumir que o processo auto-imune seria decorrente da perda da tolerância de linfócitos a determinados constituintes desta célula [9, 10]. Entretanto, admite-se que outros mecanismos imunopatogênicos possam estar também envolvidos, tornando seu entendimento complexo. Estudos do DM-1 auto-imune em modelos animais experimentais, fortalecem a hipótese da ocorrência de desequilíbrio entre sub-populações de células T efectoras [11, 12].

A perda da tolerância imunológica no DM-1 tem sido amplamente estudada em modelos experimentais murinos, cogitando-se a existência de anormalidades da tolerância central tímica e periférica [13]. Assim, em decorrência da falha no bloqueio, anergia e supressão periférica da reatividade anti-células β , ocorrem respostas que são coordenadas por linfócitos T $CD4^+$ e direcionadas a constituintes da células β , que são processados e expostos por células apresentadoras de antígenos (APC), favorecendo, deste modo, a manifestação do DM-1 [13].

A expressão de peptídeos imunogênicos na célula β , introduzidos por toxinas e infecções virais, podem aumentar a suscetibilidade a reações auto-imunes [11]. Além disso, a predisposição genética do indivíduo para a destruição auto-imune, juntamente com fatores ambientais, parece favorecer o desencadeamento dos mecanismos de auto-imunidade [6].

O papel do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na predisposição genética ao DM-1, está estabelecido com a associação de genes I-A e I-E com a manifestação dessa doença. Esses genes influem no desenvolvimento do DM-1

através da seleção positiva de clones auto-reativos no timo e, ainda pela ausência de anergia periférica de clones auto-reativos [14, 15].

Diversos autores propõem que fatores variados de agressão, como citocinas liberadas pelos linfócitos T, atuem na destruição da célula β pancreática [16-18]. Tais moléculas mediarão o processo inflamatório local, alterando a função das células β e contribuindo para a destruição das ilhotas pancreáticas.

Acredita-se, também, na existência de efeitos citotóxicos dessas moléculas sobre as ilhotas pancreáticas induzindo a apoptose das células β [19-22]. Modelos animais geneticamente predispostos ao diabetes tipo 1, como os camundongos da linhagem NOD (diabético não obeso), foram alvo de investigação da doença, sustentando a hipótese da participação dos linfócitos T na imunopatogenicidade dessa doença.

1.2- Camundongos NOD

Além de outros modelos experimentais como o rato Bio Breeding (BB), o camundongo NOD é um importante modelo usado progressivamente para diabetes tipo 1. Desde seu desenvolvimento há mais de 20 anos, essa raça tem proporcionado um grande avanço no processo complexo natural envolvendo doenças auto-imunes. Originalmente, o NOD foi desenvolvido no Japão a partir de seleção de raça com catarata (ICR). Durante o acompanhamento desta linhagem, uma sublinhagem diabética espontânea foi observada e, por meio de cruzamentos repetitivos entre irmãos, estabeleceu-se a linhagem NOD [6, 23].

No Brasil a colônia foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas [24], a partir de colônias matrizes provenientes do Laboratório INSERM U-25 Neker, Paris, França.

A incidência do diabetes espontâneo da linhagem NOD nas várias colônias distribuídas pelo mundo, varia entre 50 e 90% em fêmeas e entre 0 e 20% em machos [6, 11]. Atualmente, no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental - LIAE da UNICAMP, esta linhagem apresenta incidência entre 70 e 90% nas fêmeas e ao redor de

20% nos machos. A manutenção deste fenótipo depende das condições de armazenamento da linhagem que deve ser mantida em ambiente livre de patógenos específicos (SPF). Contudo, se não obedecidas tais condições, a incidência do diabetes diminui [11, 25, 26]. O diabetes inicia tipicamente entre 12^a e 14^a semana de vida nas fêmeas, com período de incidência máxima ao redor da 17^a semana de vida e mais tardiamente nos machos. Estudos histológicos demonstraram que poucas células imunes infiltradas são observadas nas ilhotas entre a 3^a e 4^a semanas de idade, quando machos e fêmeas começam a demonstrar infiltrados mononucleares periféricos nas ilhotas (periinsulite), sendo esta fase considerada como pré-diabética. Durante o período pré-clínico, pode-se verificar a presença de anticorpos anti-ilhota pancreática e anti-insulina endógena no soro destes animais, além de alterações metabólicas como a deterioração da fase rápida de secreção insulínica [27]. Adicionalmente ao diabetes espontâneo o NOD apresenta outras manifestações auto-imunes como sialite [28], tireoidite [29] e neuropatias [30].

A expressão do DM-1 espontâneo neste modelo animal é caracterizada por dois períodos: o primeiro por infiltração progressiva das ilhotas de Langerhans por células mononucleares (inicialmente células CD4⁺, e posteriormente CD8⁺, ou insulite, que se inicia ao redor da quarta semana de vida; a segunda pela destruição das células β produtoras de insulina [6]. A maioria das células mononucleares infiltradas são células T CD4 e mais tardiamente células T CD8, NK, células B, células dendríticas e macrófagos, que podem ser identificados na lesão [6, 23]. É possível que as células B possam influenciar na produção de anticorpos ou nas células apresentadoras de antígenos envolvidas na seleção ou ativação de linfócitos T autoreativos [31]. Linfócitos B ativados estão aptos para serem células apresentadoras de antígenos com capacidade de capturar e apresentar antígenos para os linfócitos T [32]. Linfócitos T CD4⁺ estão envolvidos na patogenia da doença e pode mediar diretamente a destruição das ilhotas [31]. Entretanto, há evidências da destruição de células pancreáticas por células CD8⁺ antes da forte resposta das células T CD4⁺ [33].

YOUNG e colaboradores [34], administrando anticorpos anti-CD3 em camundongos NOD verificaram o efeito direto desses anticorpos nos linfócitos T, mostrando rápido aumento de células beta saudáveis e a mudança fenotípica das células apresentadoras de antígenos. Em outro estudo, com a administração de vacina da toxina do

cólera e insulina nos camundongos NOD, foi observado a redução da inflamação nas ilhotas pancreáticas e o desenvolvimento dos sintomas de diabetes[35]. Reddy e colaboradores[36], administraram estreptozotocina nos camundongos NOD e verificaram a redução do número de células beta, a infiltração dos macrófagos anterior ao tempo esperado e o aumento de insulite.

1.3- Imunorregulação e Citocinas

A resposta imune é coordenada por linfócitos T auxiliares (Th-T *Helper*), cujas funções diferem de acordo com o estímulo antigênico e condições do compartimento onde ocorre a resposta. Desta forma, os linfócitos Th são ainda subdivididos em Th1, caracterizados pela expressão local de citocinas específicas como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10). A resposta Th1, genericamente, manifesta-se nas doenças auto-imunes mediando a inflamação através da resposta imune celular, representada por linfócitos T citotóxicos, “*natural killer*” e macrófagos. Por outro lado, o fenótipo Th-2 direciona a resposta imune humoral liberando localmente citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 [20]. No contexto dos possíveis mecanismos envolvidos nas desordens auto-imunes, o desequilíbrio entre as populações de linfócitos Th1 e Th2 com predominância do fenótipo Th1 parece ter substrato na fisiopatologia da quebra de tolerância [37] e reações auto-imune que ocorrem na linhagem de camundongos NOD.

O padrão de resposta observado tanto em pacientes quanto nos camundongos NOD com DM-1 é marcado pelo predomínio de citocinas características da resposta Th1 [20, 22, 38]. Acredita-se que ocorra, ainda, o envolvimento direto de linfócitos com propriedades efetoras sobre as células β pancreáticas (células alvos) resultando na liberação de mediadores solúveis responsáveis pelo processo inflamatório local, contribuindo para a destruição das ilhotas [39-42]. No campo experimental, diversos autores têm estudado os efeitos *in vitro* de citocinas como IL-1 β , TNF- α , TNF- β e IFN- γ utilizando ilhotas isoladas de modelos animais [20, 37, 43] que em ilhotas pancreáticas recém isoladas, mostraram que essas citocinas são capazes de, isoladamente, inibir a liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas e, combinadas, de induzir a fragmentação do DNA e destruição das células β

pancreáticas [19, 20, 37, 43]. Contudo, é possível que estudos *in vitro* não representem a magnitude da fisiopatologia da lesão pancreática que ocorre *in vivo*. A simples presença da citocina na lesão da insulite não identifica seu papel na patogênese do DM-1, uma vez que esta pode ter função pro-inflamatória ou antiinflamatória [37].

No camundongo NOD, a expressão de IFN- γ nas ilhotas foi relacionada com a insulite destrutiva [22, 43-45]. Essa citocina, assim como TNF- β , tem sua expressão aumentada de forma consistente com o envelhecimento dos camundongos NOD sugerindo que a destruição da ilhota e a manifestação do DM-1 associam-se com o aumento da secreção dessas citocinas pelas células do infiltrado inflamatório [46]. Reforçando a importância de estudos experimentais *in vivo*, pode-se observar em experimentos de expressão transgênica de IFN- γ , em células β de camundongos normais, o papel citotóxico do IFN- γ associado a ocorrência da insulite mediada por células imunes, destruição das ilhotas pancreáticas e manifestação do DM-1 [47].

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos citotóxicos das citocinas nas ilhotas pancreáticas, induzindo a liberação de óxido nítrico, precedendo a lesão do DNA e ocasionando a destruição de células beta [20, 37, 42, 43, 48]. Sendo assim, pode-se sugerir que a destruição das células β ocorre por apoptose, onde a fragmentação de DNA típica tem sido observada em ilhotas pancreáticas tratadas com a combinação de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ [21, 43, 49, 50].

De acordo com os dados experimentais expostos por INGELSSON [51] e THOMAS [52], outros mediadores são capazes de efetuar a destruição das células β (como por exemplo, perforina e granzimas que são conteúdos granulares de linfócitos T CD8⁺, moléculas de superfície e outros membros da família TNF), e fica demonstrado, então, que a destruição das ilhotas pancreáticas depende da somatória de efeitos de várias citocinas. Na tentativa de explicar os mecanismos moleculares envolvidos na destruição das células β induzida pelas citocinas, aponta-se a produção de óxido nítrico e radical livres pelas células expostas às citocinas, os quais podem estimular a resposta imune adaptativa pró-inflamatória Th1 [53, 54].

Recentemente, NARANG e colaboradores [55] demonstraram o processo pelo qual ocorre a destruição das células das ilhotas. Inicialmente a citocina IL-1 β ativa seu receptor antagonista (IL-1ra), o qual inicia a cascata de eventos bioquímicos intracelulares. Esses efeitos são potencializados pelo TNF- α e IFN- γ e esse caminho é conduzido pela ativação do NF κ B, que induz a expressão do iNOS, liberando NO, causando assim a disfunção e morte das ilhotas.

1.4- Diacereína

Diacereína (1,8-diacetoxy-9,10-dioxo-dihydroanthracene-3-carboxylic acid) é uma antraquinona com propriedades anti-inflamatórias evidenciada previamente em modelos experimentais [56, 57] e em seguida utilizada como droga antireumática [58] atuando também como analgésico e antipirético [59].

Estudos clínicos sugerem que a diacereína é droga efetiva no tratamento das artropatias inflamatórias [60, 61]. No organismo animal, a diacereína é completamente metabolizada resultando na produção de reína [62], exercendo efeitos em nível celular podendo inibir a produção de ânion superóxidos, quimiotaxia, atividade fagocítica, migração de macrófagos e fagocitose [59]. Tanto a diacereína como a reína, têm como propriedades a inibição da síntese e da atividade de citocinas pró-inflamatórias, principalmente de IL-1 β [63], além da redução da produção de ânions superóxidos de neutrófilos por meio da diminuição dos níveis de RNAm de iNOS [64].

No diabetes mellitus tipo 1, o processo inflamatório, como descrito anteriormente, é influenciado pelas citocinas IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , que contribuem para o estágio inicial da destruição autoimune das células β pancreáticas. Sabe-se que a reína inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e a família da IL-1, como dito anteriormente, especialmente IL-1 β e IL-1ra (receptor antagonista de IL-1 β) [65]. A IL-1 β é liberada nas ilhotas por macrófagos e a sua ação inclui a produção de NO ativando a apoptose [66].

MENDES e colaboradores [67], mostraram que a diacereína suprime IL-1 β induzido pela degradação da I κ B- α , inibindo a ativação de iNOS pela ação a nível transcricional e na mesma concentração que evita a ativação de NF κ B. Desta forma, sugere-se que a diacereína inibe a IL-1 β induzida pela expressão iNOS prevenindo a ativação de NF- κ B e assim, inibindo a produção de NO.

Poucos estudos acerca da diacereína estabeleceram sua posologia adequada. DOUNI e colaboradores [68], estudando o processo inflamatório de poliartrite, verificou o comportamento da diacereína em camundongos TNF transgênicos, nas doses de 2, 20 e 60 mg/kg/dia de diacereína, verificando que a dose mais efetiva foi a de 2mg/kg/dia.

Neste contexto, a diacereína tem despertado o interesse como agente modulador da resposta imune, estimulando-se, assim, estudos voltados para a sua utilização potencial na modulação da resposta inflamatória em algumas doenças autoimunes. Além disso, a diacereína é droga imunomoduladora pouco explorada em doenças que não articulares propiciando importante campo de investigação.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos Gerais

Verificar os efeitos da administração de diacereína a camundongos NOD (diabéticos não obesos) sobre a expressão de diabetes e modulação de citocinas.

2.2- Objetivos Específicos

1. Analisar qualitativamente a presença de diacereína no soro e pâncreas dos animais tratados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
2. Estudar os efeitos da diacereína sobre a incidência do diabetes em animais.
3. Classificar as alterações morfológicas segundo definição de escores pré-estabelecidos, através de microscopia óptica e imunohistoquímica nos animais tratados com diacereína e compará-las com o grupo tratado com solução salina.
4. Analisar a expressão gênica de citocinas IL-1 β , IFN- γ , IL-12 e TNF- α nas ilhotas e células esplênicas (resposta periférica) dos camundongos tratados com diacereína, utilizando RT-PCR e ELISA.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Grupos Experimentais

Para a realização deste estudo, foram utilizados 110 camundongos NOD fêmeas, retiradas do CEMIB com 4 semanas de idade, das quais 30 eram tratadas com 5mg/kg/dia, 30 com 10mg/kg/dia, 30 com 50mg/kg/dia de diacereína e 20 animais eram tratados com solução salina. A partir de seu recebimento, os animais eram mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental DCM/FCM/UNICAMP sob condições sanitárias livres de patógenos conhecidos (SPF), com controle de luz, temperatura e umidade, recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais eram sacrificados ao completarem 28 semanas de vida, de acordo com o protocolo estabelecido para cada grupo experimental, ou quando apresentassem duas dosagens de glicemias consecutivas acima de 250 mg/dL [69, 70]. As condições de manutenção dos animais e sacrifício estavam de acordo e com a aprovação do comitê de ética em pesquisas animais da Unicamp.

Os grupos eram subdivididos conforme a seguir:

D5: Grupo tratado com 5mg/kg/dia.

D10: Grupo tratado com 10mg/kg/dia.

D50: Grupo tratado com 50mg/kg/dia.

Salina: Grupo tratado com solução salina.

3.2- Procedimentos

3.2.1- Diagnóstico do Diabetes, sacrifício dos animais e extração de órgãos

A glicemia era verificada semanalmente após a 10^a semana de vida, retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal e submetida a glicofita (PrestigeTM LX, HDI Home Diagnostics Inco, EUA). Os animais eram considerados diabéticos após constatação de duas glicemias superiores a 250 mg/dL, estabelecido no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental e em concordância com ITOH e colaboradores [69]. Os animais

diabéticos eram submetidos à anestesia intraperitoneal de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) e sacrificados. O sangue periférico era coletado por meio de punção cardíaca, seguida da remoção do pâncreas e baço. O pâncreas era depositado em cápsulas contendo meio de inclusão O.C.T (Tissue Tek Miles – EUA) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e a seguir conservados em “bio-freezer” a - 80°C até processamento histológico.

3.2.2- Extração de Células Esplênicas

Os baços eram macerados utilizando pequenas peneiras estéreis e lavados por 3 vezes em solução de Hank (Sigma) e centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm. Após a primeira centrifugação, eram tratados com tampão de lise para eliminar os eritrócitos. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes em solução Hank. As células mononucleares assim isoladas eram armazenadas a -80° C até processamento de RNA total para análise de expressão gênica da citocinas em estudo.

3.2.3- Isolamento de ilhotas

As ilhotas eram isoladas seguindo-se a técnica originalmente descrita por MOSKALEWSKI[71], aplicada a pâncreas murino por LACY e KOSTIANOVSKY [72], com algumas modificações introduzidas por BOSCHERO e colaboradores [73] e adaptações, quanto ao tempo de reação e concentração de collagenase, realizadas no nosso laboratório por VENTURA-OLIVEIRA e colaboradores [22], visando melhorar o rendimento, conforme descrição a seguir.

Animais dos grupos tratados com diacereína e salina ao completarem 28 semanas de vida, eram anestesiados utilizando-se Thiopental sódico 3% (15 a 30mg/kg de peso corpóreo). As cavidades abdominal e torácica eram abertas e o pâncreas localizado. Após distensão e seu isolamento dos outros órgãos, o pâncreas eram infundido com solução de Hank contendo 2mg/ml de collagenase (Sigma) através de seringa até o seu intumescimento. A seguir, o órgão era removido e transferido para uma placa de Petri onde

sofria fragmentação suave com o auxílio de tesoura cirúrgica. A suspensão era transferida para tubo de ensaio vedado com rolha e encubado em banho térmico a 37°C durante 24 minutos. Decorrido esse período e sob o banho térmico, o tubo era agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto, para finalizar a digestão do órgão. Em seguida, o conteúdo era transferido para um Becker de 100ml e adicionado Hank gelado até completar volume de 80ml. Após intervalo de 2 minutos, aspirava-se o sobrenadante com uma seringa de vidro de 20ml. Repetia-se este procedimento três vezes com a finalidade de separação do tecido adiposo, collagenase e enzimas pancreáticas.

O isolamento das ilhotas era realizado manualmente através de lupa, colocando-se por volta de 10 ml da suspensão de ilhotas em Hank contendo 2,8mM de glicose e 3mg/ml de albumina em uma placa de Petri com fundo escuro. As ilhotas eram coletadas por aspiração, com auxílio de pipeta Pasteur, estirada e tratada com albumina (solução de Hank contendo 10mg/ml albumina). A seguir, eram transferidas para outra placa de Petri com fundo escuro com Hank contendo 2,8 mM de glicose e 3mg/ml de albumina. A partir desta solução límpida realizava-se uma nova coleta. As ilhotas coletadas eram transferidas para tubo plástico de 1,5 mL livre de Rnase, adicionando-se a seguir cerca de 400µl de solução preservadora de guanidina-sarcosil . Esta preparação era mantida em bio-freezer à -80°C até a sua utilização nos procedimentos programados.

3.2.4- Detecção sérica de Diacereína por HPLC

A fase móvel era preparada com acetonitrila acrescida de tampão (55:45, v/v). O tampão com pH 2.2 era preparado combinando 19,6 ml de ácido cítrico 0,1 M com 0,40 ml de fosfato dissódio 0,2 M. A vazão controlada era de 0,8 ml/min, para 20µl da amostra e detecção no comprimento de onda de 258 nm. A coluna utilizada era C-18 (Applied Biosystems- RP-18/ 5 micron) e cromatógrafo, ÄKTA Purifier 10- Amersham Biosciences – GE Helathcare (Uppsala – Sweden) .

Uma solução padrão de diacereína e seu metabolito (reina) era preparada na concentração de 100µg/ml em N,N – dimetilacetamida. Após a evaporação do solvente, o resíduo era dissolvido na fase móvel (1 ml) e aliqotado para aplicação na coluna de

cromatografia. O soro era preparado adicionando acetonitrila (v : v), seguida de agitação vigorosa por 1 minuto e centrifugação por 5 minutos a 12000 rpm (1600 x g) e 20 µl de sobrenadante desta preparação era submetida à HPLC.

O pâncreas era lavado em solução salina, triturado e centrifugado a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante era retirado, acrescido de acetonitrila e centrifugado nas mesmas condições descritas. O sobrenadante era retirado, aliquoteado e 20 µl da preparação era injetada no sistema de HPLC [74].

Para a análise dos dados, os tempos de retenção da droga na coluna, do soro e pâncreas, eram comparados com o tempo de retenção da droga isolada. A coincidência entre os tempos de retenção, referência e amostras, indica a presença da medicação no tecido e soro.

3.2.5- Análise Morfológica

Os pâncreas congelados em meio de inclusão eram transferidos e posicionados no suporte do criostato (Leica, CM 1850, Alemanha) de maneira a se obter maior área possível de corte. Os cortes eram coletados em série de seis cortes consecutivos de 5µm de espessura e depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (γ -Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane - Sigma St Louis, EUA). Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas era desbastado 300µm e, a seguir, outra série de seis cortes era igualmente processada. Repetia-se este procedimento quatro vezes.

As lâminas nº: 1, 7, 13 e 19, eram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina, observadas em microscópio óptico (Axioscope, Zeiss, Darmstad-Alemanha), permitindo detectar a presença de infiltrado inflamatório em toda extensão do órgão. As ilhotas de langerhans nas quais se evidenciava a presença de infiltrado inflamatório eram classificadas segundo o grau de insulite apresentado e o número total de ilhotas, contados. As lâminas subsequentes eram utilizadas para a caracterização linfocitária para CD4⁺, CD8⁺, CD11⁺.

A classificação utilizada nas ilhotas pancreáticas, segundo o grau de insulite apresentado, era realizada segundo os critérios propostos por SIGNORE e PAPACCIO e colaboradores[75, 76], adaptados em nosso laboratório [22].

0 = ilhota normal, na ausência de infiltrado.

1 = peri-insulite, presença < 25% de infiltrado ao redor e no interior da ilhota.

2 = insulite moderada, 25 - 80% da ilhota invadida pelo infiltrado.

3 = insulite invasiva, > 80% da ilhota invadida pelo infiltrado. Ocupação extensiva da ilhota.

4 = insulite destrutiva, invasão total da ilhota pelo infiltrado com desestruturação da ilhota.

As ilhotas eram contadas e classificadas por grau em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados eram representados pela média referente a relação número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, para cada grupo experimental, e calculava-se o Índice, segundo a fórmula[79]:

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

Índice = 1 desestruturação total da ilhota

0, 1, 2, 3 e 4 representam os diferentes graus de insulite (como descrito anteriormente) e N_0, N_1, N_2, N_3 e N_4 o número total de ilhotas com seus respectivos graus de infiltração.

3.2.6- Fenotipificação do infiltrado inflamatório

Para a especificação do infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas, procedia-se a fenotipificação do infiltrado quanto à presença de linfócitos T por meio de marcadores de membrana $CD4^+$ (lâminas 3, 9, 15, 21), $CD8^+$ (4, 10, 16 e 22) e macrófagos

CD11⁺ (lâminas 5, 11, 17 e 23), provenientes de cortes histológicos congelados. Empregava-se a técnica de imunofluorescência indireta. As lâminas após prévia fixação em acetona gelada durante 15 minutos eram lavadas três vezes, durante 5 minutos, em PBS (solução de salina fosfatada tamponada) e em seguida os cortes eram incubados em 2,5% BSA V (albumina bovina fração V; GibcoBRL, EUA); 2% leite desnatado em pó e 8% Soro Fetal Bovino (HyClone – Utah, EUA) durante 45 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos. Aproximadamente 50µl de anticorpo primário anti-CD4 (L3T4 produzido em rato), anti-CD8 (produzido em rato) e anti-CD11(produzido em rato), na concentração de 1:25 (BD PHARMINGEN, Califórnia, EUA), eram adicionados e incubados durante a noite a temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, as lâminas eram lavadas três vezes, durante 5 minutos, em PBS. Após, adicionava-se 50µl do anticorpo secundário fluoresceína (10 µg/mL) conjugado FITC anti-IgG de rato para CD4, CD8 e CD11 (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA) e incubado por duas horas nas mesmas condições descritas anteriormente. As lâminas eram lavadas em PBS e montadas em glicerol. As imagens eram capturadas em microscópio Leica DM 4500B e programa Leica FW 4000.

3.2.7- Extração de RNA Total

As amostras de RNA total eram extraídas de células esplênicas por meio do método de Guanidina Tiocianato - Fenol- Clorofórmio [78], adaptado por BOECHAT [81] e VENTURA-OLIVEIRA [22].

Para a separação de proteínas e ácidos nucléicos, adicionou-se um volume igual de tampão Fenol: Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1), agitando-se vigorosamente para formação de emulsão. Posteriormente, a preparação era submetida à centrifugação por 5 minutos à temperatura ambiente a 10.000g, recuperando-se a fase superior. Este processo era repetido por duas vezes, ou até a obtenção de material totalmente límpido. A retirada do excesso de Fenol era realizada pela extração com Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1). O RNA na fase aquosa era precipitado pela adição de 3 volumes de etanol absoluto e acetato de sódio pH 5.2, na concentração final de 0,3M. Esta preparação era mantida à - 80°C pelo período mínimo de 24 horas. Posteriormente, a preparação era centrifugada a 14.000g por

20 minutos a 4°C. Após a retirada do etanol, o precipitado era diluído em 40µl de água ultra pura preparada com Dietil Pirocarbamato (DEPC) (Sigma, EUA).

A qualidade do RNA total extraído era analisada pela relação espectrofotométrica de OD260/OD280 das preparações de RNA. Considerando-se adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8. Para a quantificação do RNA total aplicava-se a fórmula: $OD260/0,025 \text{ diluição de leitura}/1000 = \text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.2.8- Transcrição Reversa do RNA Total Extraído (cDNA)

Para a síntese do cDNA eram padronizados 5µg de RNA total de amostras de células esplênicas e ilhotas pancreáticas para a realização do RT-PCR final. Adicionava-se à amostra 0,5µl de Oligo d (pt) e água ultra pura em quantidade suficiente para 28µl. Os tubos eram aquecidos com as respectivas amostras em termocicladora (GeneAmp→ 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65°C e resfriava-se para 4°C por 5 minutos. Para a ligação complementar dos nucleotídeos ao RNA, adicionava-se 21µl de solução mãe (10µl de tampão SuperScript III, 5µl de dNTP mix 0,5mM, 5µl de DTT 0,1M, 1µl de RNase out, Invitrogen, EUA) incubando-se por 2 minutos a 42°C. Após adição de 1µl de enzima Super Transcriptase reversa (500U, Invitrogen), a reação processava-se na termocicladora programada para 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e resfriamento da amostra até 4°C [79]. Após a ultima etapa as amostras eram armazenadas a -20°C como DNA complementar (cDNA).

3.2.9- Amplificação do cDNA pela Transcriptase Reversa da Reação de Polimerase em Cadeia (RT-PCR)

O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação 2µl de amostra de cDNA, 100ng de primer 5'sense, 100ng de primer 3'anti-sense, 45µl de solução de reação (5µl de tampão Taq polimerase (Invitrogen); 5µl de dNTP mix 5nM, 1,5µl de MgCl₂ 50mM e 33,5µl de água ultrapura), 2µl de cDNA e 1µl de óleo mineral.

Em seguida os tubos eram transferidos para termocicladora nas seguintes condições programadas: Desnaturação a 94° C por 2 minutos, 80°C por 5 minutos para amplificação de 1µl da enzima taq polimerase - *Thermus aquaticus* DNA polimerase gene. Pareamento 58°C por 45 segundos, extensão dos primers a 72°C por 90 segundos, desnaturação dos primers a 95°C por 45 segundos, 40 ciclos, extensão final 72°C por 10 minutos, temperatura de espera 4°C. Os produtos das PCR eram armazenados a -20°C.

3.2.10- Análise da RT-PCR por Eletroforese em Gel de Agarose

A amplificação do cDNA com os respectivos primers para IL-1β, TNF-α, IFN-γ e IL-12 (Tabela1) era analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% e revelados com brometo de etídio, através de excitação em UV e o registro feito através do sistema de documentação fotográfica NucleoVision, Nucleo Tech, CA, EUA. A intensidade das bandas era analisada com software GelExpert, NucleoTech, CA, EUA. Para a semiquantificação do mRNA as áreas de pixel eram determinadas pela intensidade de cada banda e comparadas com as da ciclofilina e os valores transformados em Unidades Arbitrárias (pixel index) por meio da fórmula:

Unidades Arbitrárias = (pixel das citocinas ou apoptose/ pixel da ciclofilina do respectivo grupo) x 100.

Tabela 1- Primers empregados nos procedimentos de RT-PCR semi-quantitativo para expressão gênica das citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12 e Ciclofilina (gene estrutural).

Primer	Sense	Anti-Sense	Produto
TNF α	5'CTTAGACTTTGCGGAGTCCG3'	5'CCCTGTCACATGGACCTGACA3'	254pb
IFN γ	5'AAGTGGCATAGATGTGGAAG3'	5'CTGGACCTGTGGGTTGTTGA3'	265pb
IL-1 β	5'AGGCTCCGAGATGAACAA3'	5'AAGGCATTAGAAACAGTCC 3'	450pb
IL-12	5'AGCTTTTGTGACAACCAATAAGAAC3'	5'CAAACCTCACAGAGATCTGCCTG3'	297pb
Ciclofilina	5'GACAGCAGAAAAATTTTCGTGC3'	5'GGTTCTGACTCACCGACCT3'	276pb

3.2.11- Análise da expressão sérica de citocina por método imunoenzimático (ELISA)

Placas de polietileno de fundo chato eram adsorvidas com anticorpo de captura específico para as citocinas, TNF- α (BD Biosciences SD EUA) diluído 1:250 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.5 e para IFN- γ e IL-12 (R&D Systems Inc EUA) na concentração de 4 μ g/mL, diluído em PBS pH 7.4 e incubadas overnight a 4°C. A seguir, as placas eram lavadas 3 vezes com 0,05% de Tween 20 (Merck Alemanha) em PBS. Para bloqueio dos sítios inespecíficos era utilizada solução de soro bovino fetal 1% em PBS, por 2 horas, em temperatura ambiente. As placas eram lavadas novamente por 3 vezes e, a seguir, amostras de 100 μ L de soros não diluídos eram adicionadas aos poços e incubados por duas horas em temperatura ambiente. Após lavagem, foram adicionadas 100 μ L de anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído 1:10000 em PBS e soro fetal bovino 1% , para IFN- γ e, para TNF- α eram adicionados 100 μ L de anticorpo secundário biotilado juntamente com avidina conjugada com peroxidase, diluído 1:250 em PBS e soro fetal bovino 1%. As placas eram, então, mantidas por duas horas em temperatura ambiente. Após lavagem, a reação de cor era produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB BD OptEIA™), sendo bloqueada após 30 minutos, com H₂SO₄ 0,1M. Valores de absorbância em 450nm foram calculados pela subtração da densidade óptica obtida dos poços sem o antígeno (branco) contra uma curva realizada juntamente com o experimento. A leitura e os cálculos eram realizados através do sistema Spectra Max 190.

3.2.12- Análise estatística

Os resultados eram expressos como média e desvio padrão. Os dados eram submetidos à análise de variância (ANOVA) entre grupos e seus respectivos controles pelo teste de Mann-Whitney (não paramétrico) era aplicado para comparação entre os grupos tratados e. Eram considerados estatisticamente significativos $p < 0,05$. Para análise do efeito da diacereína sobre a expressão do diabetes, a razão de chance da condição nos expostos e não expostos era calculada, assim como o intervalo de confiança (95%).

4- RESULTADOS

4.1- Efeitos da administração de diacereína nas diferentes concentrações quanto a manifestação do diabetes e destruição das ilhotas pancreáticas

Todos os grupos tratados com diacereína apresentaram menor índice de diabetes D5 (53,33%), D10 (40%), D50 (53,33%) comparados ao grupo de camundongos que receberam solução salina sendo este o grupo controle (75%). Contudo, no grupo D10, a análise cumulativa da expressão do Diabetes Mellitus foi menor em relação aos grupos tratados com diacereína e os animais que receberam salina (Figura 1).

Notou-se também, que o maior número de animais diabéticos no grupo salina ocorreu por volta da 17ª semana de vida e nos grupos tratados com diacereína houve maior número de animais diabéticos por volta da 20ª semana de vida, retardando o aparecimento da doença.

Foi calculada a razão de chance da condição nos expostos e não expostos para analisar o efeito da diacereína sobre a expressão do diabetes, levando em consideração o intervalo de confiança. O risco relativo dos grupos D5 e D50, foi de 0,71, com intervalo de confiança de 0,45 a 1,11 e do grupo D10, 0,53, com o intervalo entre 0,31 e 0,89. Esses valores indicam o favorecimento do tratamento com diacereína em relação à doença.

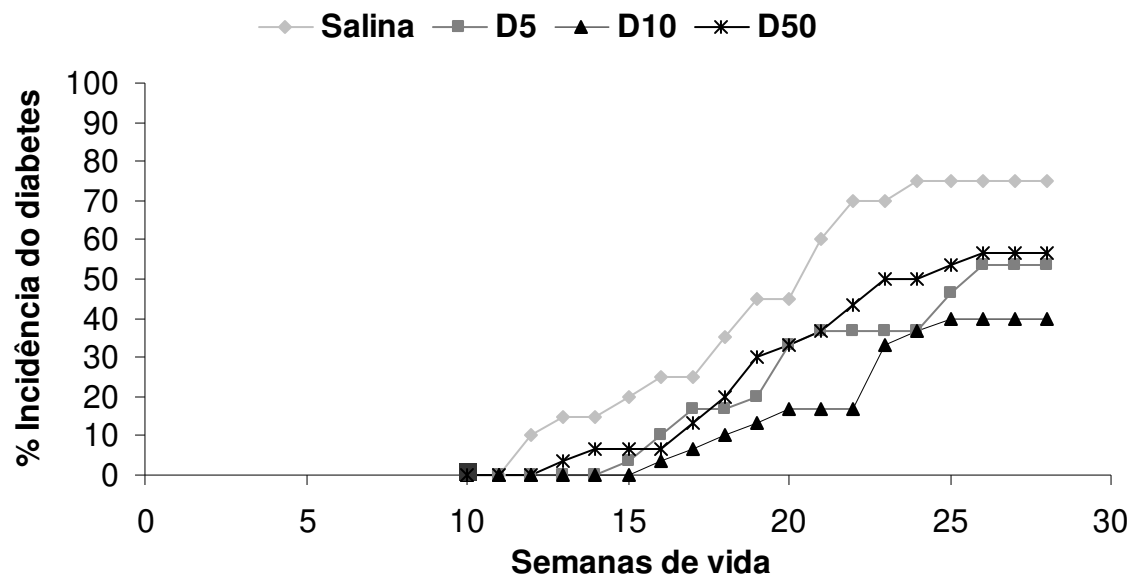


Figura 1- Gráfico representando a frequência cumulativa do diabetes em camundongos NOD fêmeas tratados com diacereína em diferentes concentrações D5 (53,33%; N=16), D10 (40%; N=12), D50 (53,33%; N=16) e o grupo de camundongos que receberam solução salina sendo o grupo controle (75%; N=15).

Para verificação do processo inflamatório, lâminas de pâncreas provenientes dos animais de todos os grupos experimentais foram classificadas segundo o grau de insulite, em escores já descritos em materiais e métodos. Assim, o índice de insulite nos animais diabéticos mostrou que nos grupos D5 e D50 há número mais elevado de ilhotas em grau 0, ou seja, ilhotas íntegras, quando comparado com os demais grupos (4,52% grupo Salina; 26,70% grupo D10 e 34,15% grupo D50). Porém, em relação aos animais não diabéticos, o número de ilhotas íntegras foi menor nestes mesmos grupos, principalmente o grupo D5. Já no grupo D10 ambos, diabéticos e não diabéticos, obteve o comportamento semelhante ao grupo Salina.

Em relação ao grau I na classificação de lesão morfológica, houve aumento do número de ilhotas no grupo D5 diabético (19,35% grupo salina; 27,46% grupo D5; 14,33% grupo D10 e 17,96% grupo D50) e em todos os grupos considerando os animais não diabéticos (11,59% grupo Salina; 20,10% grupo D5; 27,17% grupo D10 e 30,93% grupo D50).

Para o grau II, foi observado diminuição do número de ilhotas nos grupos D10 e D50 comparados ao grupo salina, e discreto aumento observado no grupo diabético D5 (19,29% grupo Salina e 22,68% grupo D5).

Em relação ao grau III, o grupo D10 destaca-se pela diminuição do número de ilhotas nos animais diabéticos comparados com o grupo não diabético (24,72% grupo Salina diabético e 34,85% grupo D10 diabético; 20,78% grupo Salina não diabético e 18,72% grupo D10 não diabético).

Para o grau IV, foi observado diminuição do número de ilhotas totalmente infiltradas em todos os grupos em relação a ambos controles salina, diabético e não diabético, com diminuição mais acentuada nos diabéticos dos grupos D5 e D50 (diabéticos: 27,96% grupo Salina; 8,39% grupo D5; 22,14% grupo D10 e 5,98% grupo D50 e não diabéticos: 24,75% grupo Salina; 17,52% grupo D5; 4,10% grupo D10 e 3,09% grupo D50.) Notamos também que nas ilhotas de animais não diabéticos, quanto maior a dose administrada menor a quantidade de ilhotas de grau IV, ou seja, ilhotas desestruturadas (Figura 2).

O escore de insulite é utilizado para avaliação do índice de lesão do pâncreas, ou seja, valores próximos a 1 são indicativos de desestruturação das ilhotas pancreáticas. Somente os animais do grupo D10 apresentaram os índices semelhantes aos do grupo Salina, mostrando que as ilhotas dos animais diabéticos estavam mais comprometidas que as dos animais não diabéticos. Porém nos grupos D5 e D50, surpreendentemente, esse evento ocorreu de maneira inversa, já que as ilhotas dos animais não diabéticos mostraram mais desestruturadas que as dos animais não diabéticos, confirmando os índices de graus de lesão descritos anteriormente. Os animais do grupo D50 exibem índice de desestruturação das ilhotas menor que o grupo Salina, tanto diabéticos quanto não diabéticos. Já no grupo D5 essa diferença pode ser observada somente nas ilhotas de animais diabéticos e no grupo D10 não diabéticos, ambos comparados ao grupo Salina (Figura 3).

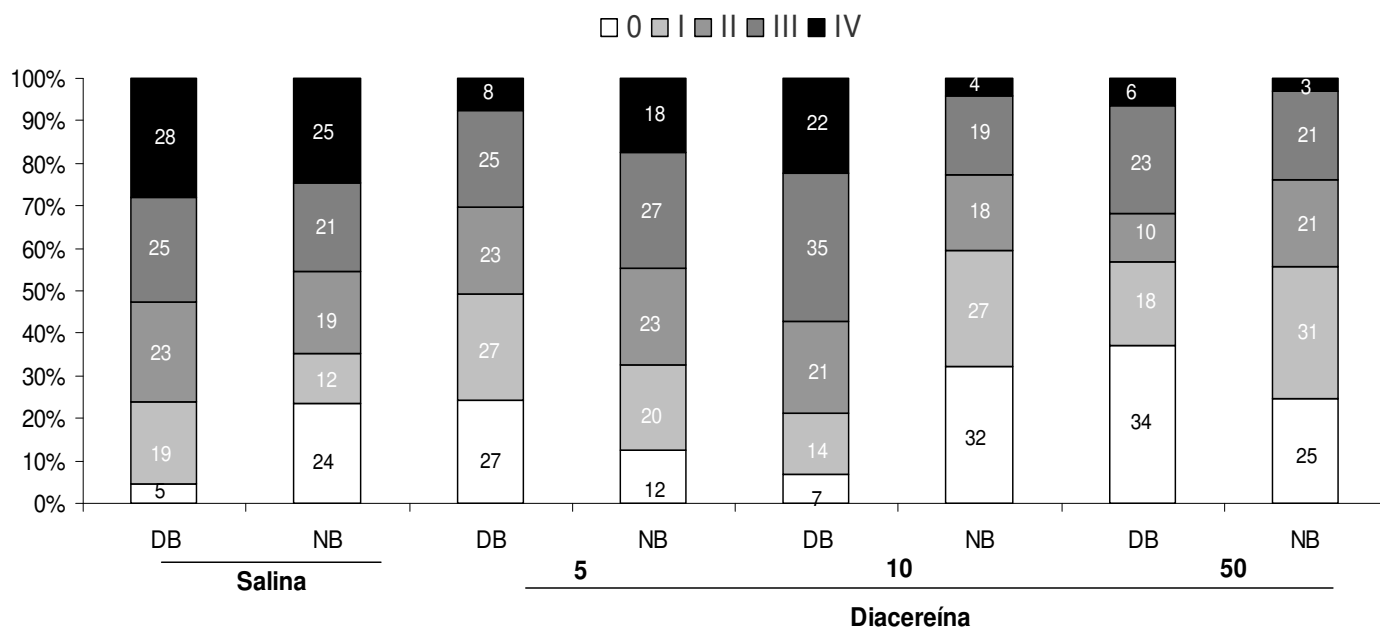


Figura 2- Classificação de ilhotas pancreáticas, segundo grau de insulite em camundongos NOD tratados com diacereína (D5, D10 e D50) e grupo Salina. Para essa análise foram utilizadas ilhotas de 6 pâncreas por grupo.

Grau 0 = ilhota normal; Grau 1= menos de 25% de infiltrado; Grau 2= entre 25 e 80% de infiltrado; Grau 3= acima de 80% de infiltrado celular e Grau 4= infiltração total da ilhota.

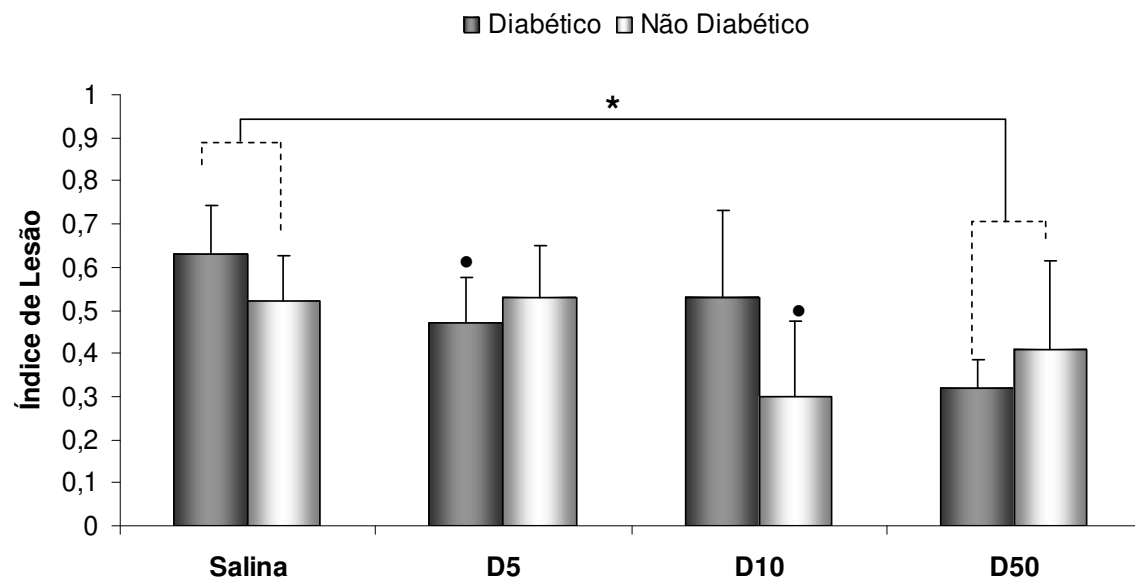


Figura 3- Índice de lesão das Ilhotas pancreáticas, quanto mais próximo a um, maior é a lesão. Análise estatística utilizando o teste Mann- Whitney, considerando $p < 0,05$.

(*) Comparação entre todo o grupo em questão com todo o grupo salina.

(•) Comparação entre grupo em questão com o grupo salina, separadamente diabéticos e/ou não diabéticos.

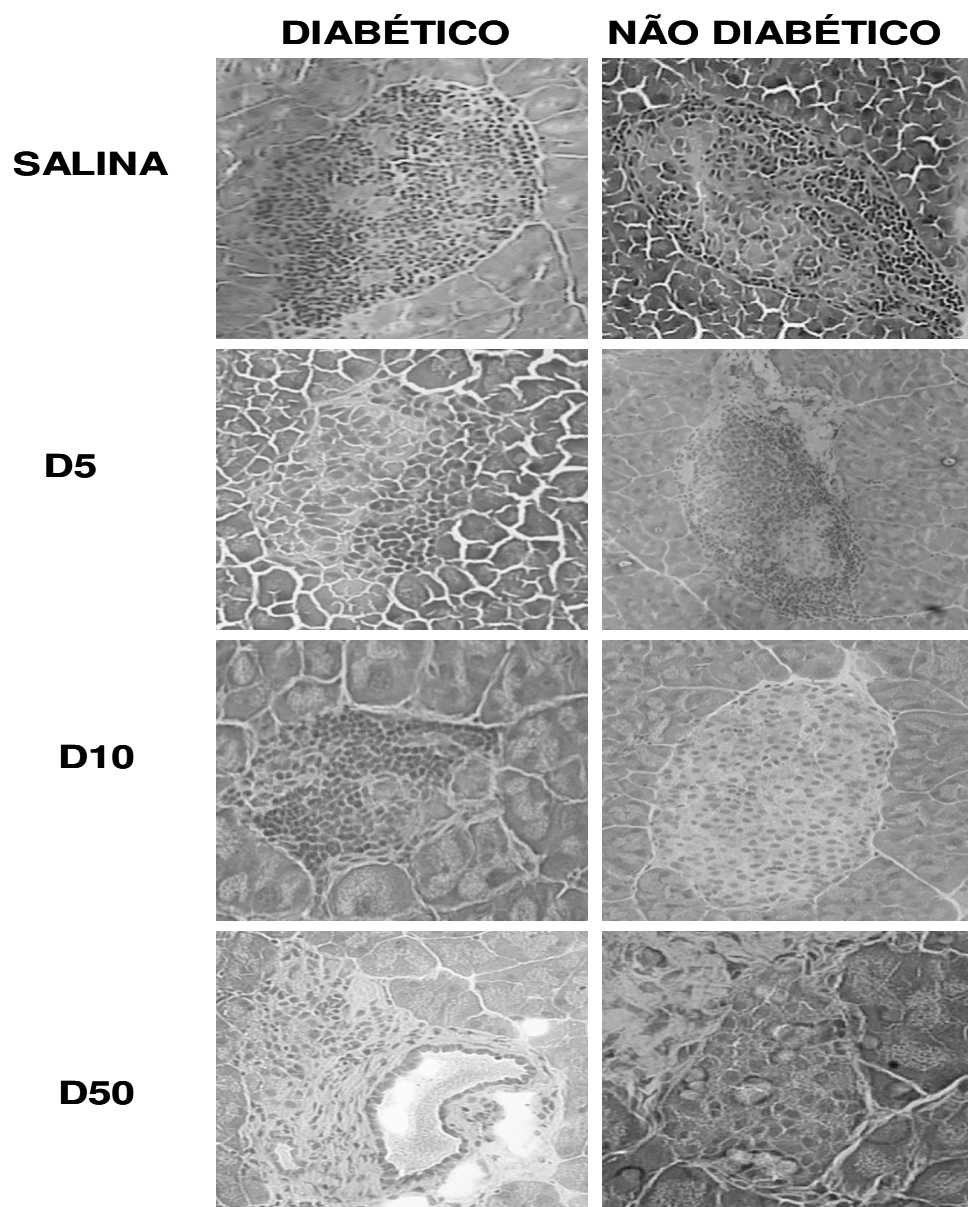


Figura 4- Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas submetidas à coloração Hematoxilina-Eosina, para a análise e classificação de graus de lesão. Imagens em aumento de 400x, representando o índice de lesão correspondente a cada grupo.

4.2- Detecção qualitativa de diacereína em soro e pâncreas por meio de HPLC

Com a finalidade de se detectar a presença de diacereína ou seu metabólito ativo reina no soro e pâncreas dos animais tratados, procedeu-se a análise qualitativa por meio de cromatografia de alta eficiência (HPLC).

O grupo D5, por ser o de menor concentração, foi eleito para as análises de diacereína sérica. Desta forma, pode-se constatar a presença de diacereína no soro dos camundongos diabéticos e não diabéticos. Para as análises foram considerados: o tempo de retenção na coluna da diacereína/soro, o tempo da droga aplicada à coluna isoladamente e o tempo do soro de camundongo NOD não tratado, acrescido da droga in vitro. Nota-se que o tempo de retenção obtido nos soros de todos os animais tratados e não tratados foi aproximadamente de 5,4 minutos. O primeiro pico assinalado no cromatograma corresponde ao ruído de injeção, sendo este o tempo 0. Assim, o verdadeiro tempo de retenção da droga na coluna foi aproximadamente 3 minutos (Figura 5).

Os ensaios de detecção da diacereína no pâncreas, representado pelo cromatograma, mostraram a presença da droga no tecido (Figura 6).

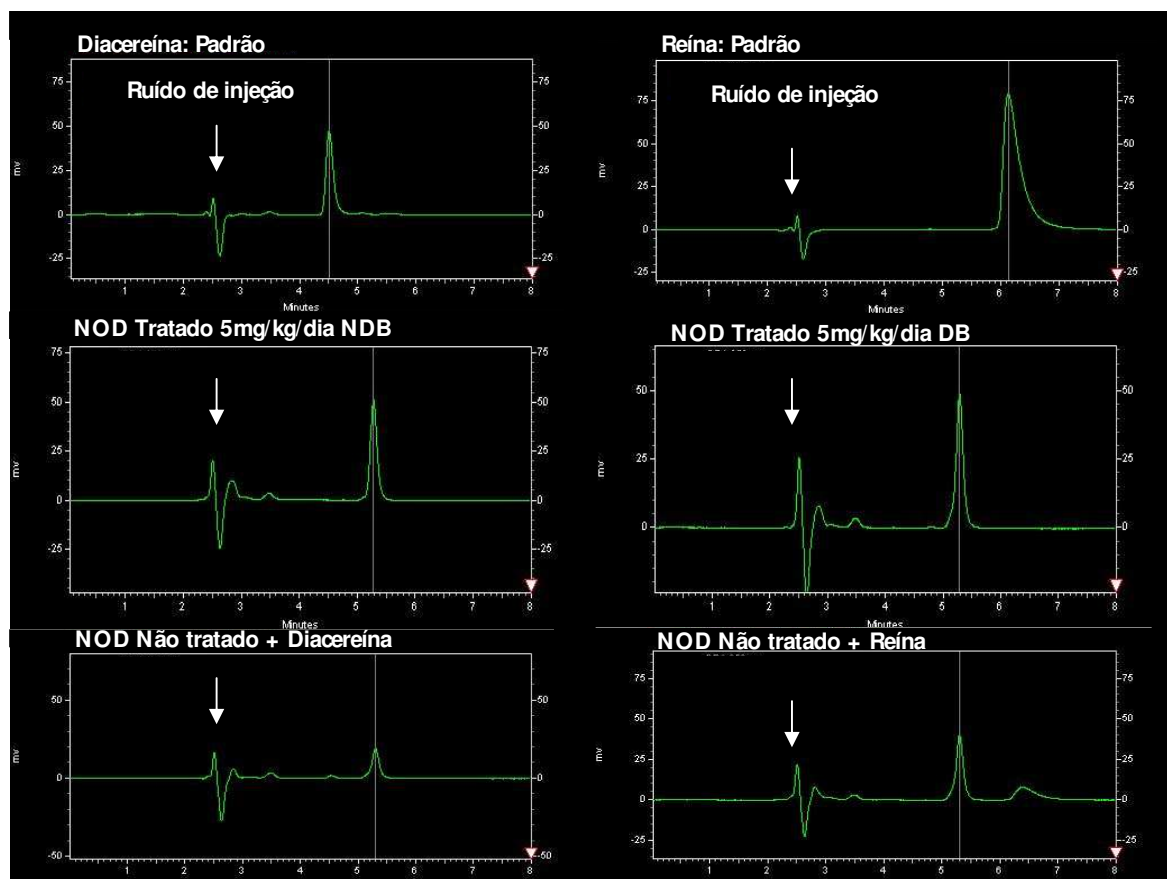


Figura 5- Cromatograma representando a presença de diacereína em camundongos tratados com 5mg/kg/dia e animais não tratados, porém ao soro destes foram adicionados à droga. Nota-se o mesmo tempo de retenção nas amostras e da droga. Tempo aproximadamente 2,5 min, desprezando o tempo anterior ao ruído de injeção. Coluna C18, vazão de fluxo 0,8ml/minuto, leitura no comprimento de onda de 258 nm.

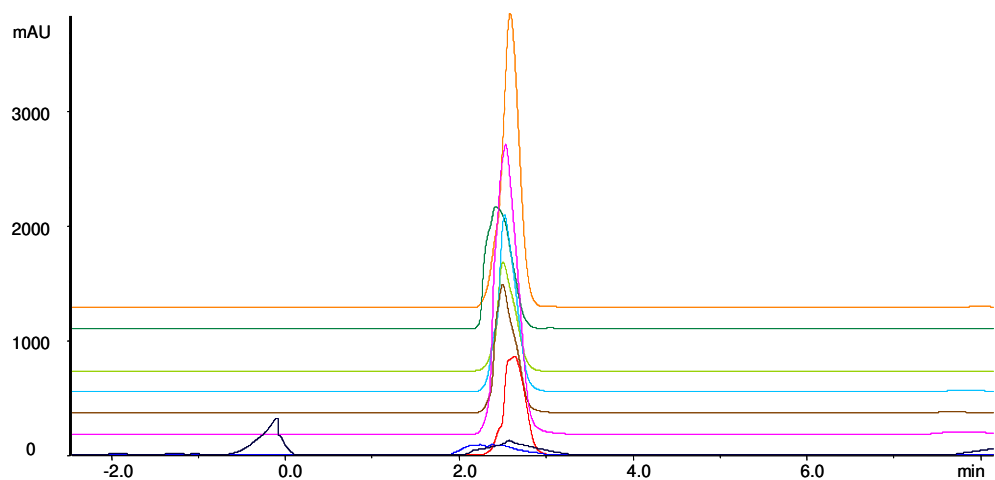


Figura 6- Cromatograma representando a presença de diacereína. Nota-se o mesmo tempo de retenção em todas as amostras de pâncreas dos animais tratados com diacereína e da droga (Tempo aproximadamente 2,5 min). Coluna C18, vazão de fluxo 0,8ml/minuto, leitura no comprimento de onda de 258 nm.

4.3- Efeitos da administração de diacereína nas diferentes concentrações sobre a expressão de citocinas em células esplênicas

IL-1 β :

A expressão do RNAm de IL-1 β em células esplênicas apresentou-se significativamente diferente nos grupos D10 e D50 comparados com o grupo Salina (DB=25,3 $\pm$ 2,4; NB=1,59 $\pm$ 0,6). No primeiro, a expressão foi aumentada (DB=69,9 $\pm$ 7,8; NB=85,5 $\pm$ 15,0; p<0,01) tanto nos animais diabéticos como nos não diabéticos, porém no segundo, essa expressão somente foi aumentada nos animais não diabéticos (NB=36,8 $\pm$ 16,6; p<0,01) e diminuída nos animais diabéticos (DB=7,37 $\pm$ 1,3; p<0,01). Já analisando o grupo D5 e o comparando também com o grupo Salina, somente houve diferença significativa nos animais não diabéticos, sendo aumentada (NB=38,2 $\pm$ 6,9; p<0,01).

Analizando somente indivíduos de cada grupo isoladamente, notou-se diferença significativa de expressão de IL-1 β nos grupos Salina, D10 e D50, sendo menor expressão nos indivíduos não diabéticos no grupo Salina e maior nos grupos D10 e D50 (Figura 7).

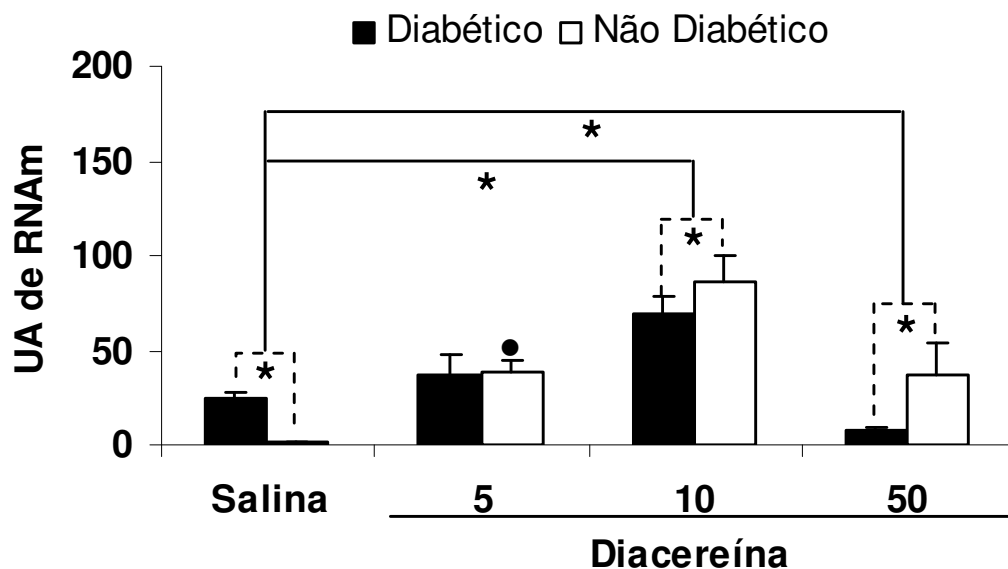


Figura 7- Expressão do mRNA da citocina IL-1 β em células esplênicas de camundongos NOD tratados com diferentes concentrações de diacereína. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.

O número de baço utilizado pra essa análise foi de 30 por grupo tratado com diacereína e 20 tratado com salina.

(*) Comparação entre todo o grupo em questão com todo o grupo salina.

(----*) Comparação entre diabéticos e não diabéticos do mesmo grupo.

(●) Comparação entre grupo em questão com o grupo salina, separadamente diabéticos e/ou não diabéticos.

IFN- γ :

O RNAm de IFN- γ em células esplênicas notou-se redução significativa no grupo D5, tanto nos animais diabéticos (DB=7,5 $\pm$ 2,28; p<0,01) quanto não diabéticos (NB=4,0 $\pm$ 2,9; p<0,01), quando comparados com o grupo Salina. Houve aumento significativo da expressão da citocina nos animais diabéticos do grupo D10 (DB=8,26 $\pm$ 4,6; p<0,01), também comparando com o grupo Salina (DB=15,8 $\pm$ 1,27; NB=27,4 $\pm$ 2,7).

Analisando os animais diabéticos, notou-se diferença significativa somente no grupo D10 onde a expressão gênica de IFN- γ estava aumentada (p<0,001), comparando com todos os grupos tratados com diacereína. Contudo, nos animais não diabéticos a diferença estava diminuída significativamente no grupo D5, quando comparado aos grupos D10 (NB=21,9 $\pm$ 14,5; p<0,05) e D50 (NB=16,2 $\pm$ 7,0; p<0,05) (Figura 8).

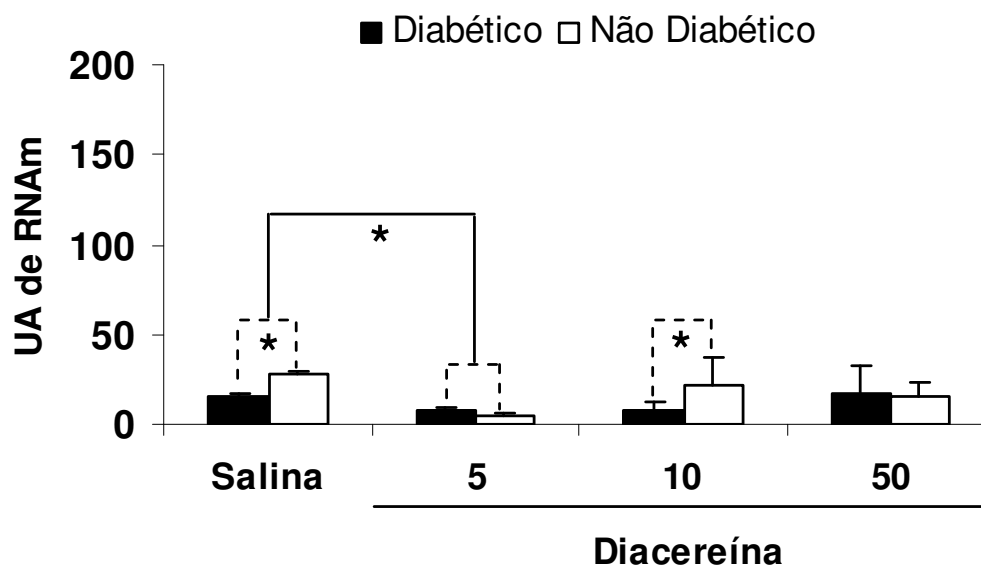


Figura 8- Expressão do mRNA da citocina IFN- γ em células esplênicas de camundongos NOD tratados com diferentes concentrações de diacereína. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.

O número de baço utilizado pra essa análise foi de 30 por grupo tratado com diacereína e 20 tratado com salina.

(*) Comparação entre todo o grupo em questão com todo o grupo salina.

(----*) Comparação entre diabéticos e não diabéticos do mesmo grupo.

IL-12:

A expressão do RNAm da citocina IL-12 diminuiu significativamente no grupo D10 (DB=71,5±19,0;p<0,01; NB=58,5±11,5; p<0,05) quando comparada com o grupo Salina (DB=138,1±5,8; NB=84,3±9,0). Da mesma forma, os níveis desta citocina estavam significativamente menores nos animais diabéticos do grupo D5 (DB= 89,0±33,5; p<0,05). Porém, quanto aos animais não diabéticos, foi observada o aumento significativo desta citocina no grupo D50 (NB=144,9±30,4; p<0,05) comparado ao grupo Salina.

Analisando cada grupo isoladamente, notou-se diminuição significativa dos níveis de IL-12 nos animais não diabéticos do grupo Salina comparado aos animais diabéticos.

Considerando somente os grupos tratados com diacereína, pode-se observar o aumento significativo no grupo D50, tanto nos animais diabéticos (p<0,01) quanto nos animais não diabéticos (p<0,01) (Figura 9).

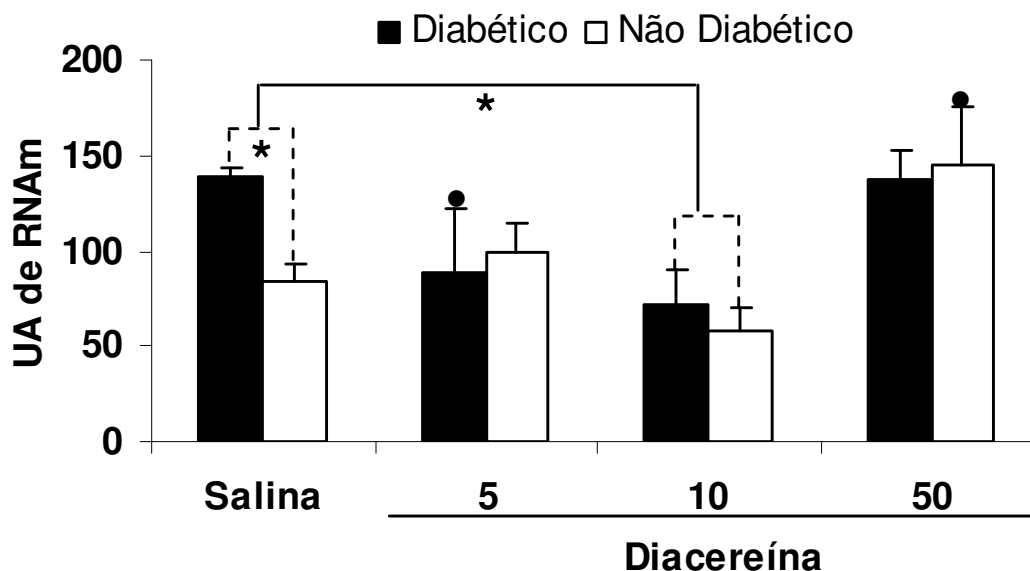


Figura 9- Expressão do mRNA da citocina IL-12 em células esplênicas de camundongos NOD tratados com diferentes concentrações de diacereína. Para a análise estatística, foi utilizado o teste Mann-Whitney , considerando $p < 0,05$.

O número de baço utilizado pra essa análise foi de 30 por grupo tratado com diacereína e 20 tratado com salina.

(*) Comparação entre todo o grupo em questão com todo o grupo salina.

(----*) Comparação entre diabéticos e não diabéticos do mesmo grupo.

(•) Comparação entre grupo em questão com o grupo salina, separadamente diabéticos e/ou não diabéticos.

TNF- α :

Analisando a expressão gênica de TNF- α nas células esplênicas, verificou-se a diminuição significativa no grupo D50 (DB=45,6 $\pm$ 11,4; NB=51,8 $\pm$ 13,9; $p < 0,01$) comparada ao grupo Salina (DB=182,0 $\pm$ 10,5; NB=90,6 $\pm$ 3,0). No grupo D5, também foram observadas diferenças significativas quando comparadas com o grupo Salina, porém com níveis mais elevados nos animais não diabéticos (NB=128,9 $\pm$ 13,3; $p < 0,01$). Contudo, no grupo D10, somente os animais diabéticos apresentaram diminuição significativa comparado com o grupo Salina (DB=127,9 $\pm$ 37,0; $p < 0,01$).

Levando-se em consideração cada grupo isoladamente, a comparação entre os grupos diabéticos e não diabéticos, somente o grupo controle apresentou diferença significativa, sendo a expressão de TNF em níveis inferiores nos animais não diabéticos ($p < 0,01$).

Entre os animais diabéticos dos grupos tratados com diacereína, somente houve diferença significativa entre os grupos D10 e D50, sendo essa expressão inferior no grupo D50 ($p < 0,05$). Ao considerar os animais não diabéticos, houve expressão desta citocina em níveis inferiores no grupo D50 comparado com os grupos D5 ($p < 0,01$) e D10 ($p < 0,01$) (Figura 10).

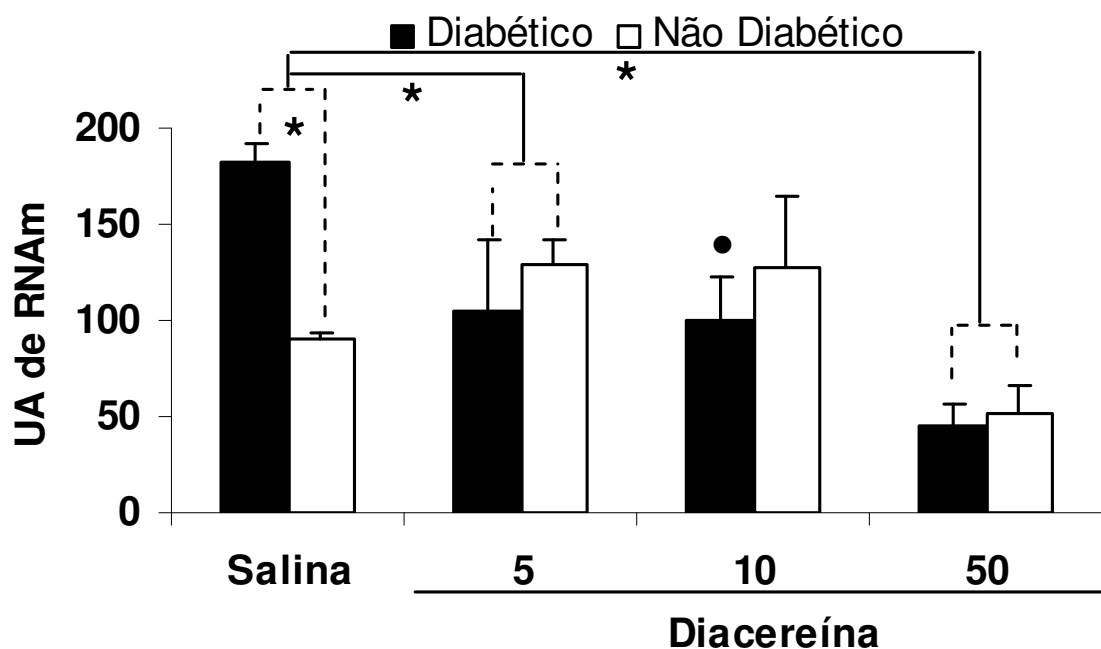


Figura 10- Expressão do mRNA da citocina TNF- α em células esplênicas de camundongos NOD tratados com diferentes concentrações de diacereína. Para a análise estatística, foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.

O número de baço utilizado pra essa análise foi de 30 por grupo tratados com diacereína e 20 tratados com salina.

(*) Comparação entre todo o grupo em questão com todo o grupo salina.

(-----*) Comparação entre diabéticos e não diabéticos do mesmo grupo.

(●) Comparação entre grupo em questão com o grupo salina, separadamente diabéticos e/ou não diabéticos.

4.4- Efeitos da administração de diacereína nas diferentes concentrações sobre a expressão de citocinas em ilhotas pancreáticas

Os níveis de RNAm de IL-1 β em ilhotas beta pancreáticas mostraram-se elevados em todos os grupos tratados com diacereína comparados ao grupo Salina. Apesar de se tratar de agrupamento (*pool*) de ilhotas, devido ao baixo número isolado nos grupos D5 (NB=105,0 $\pm$ 7,4) e D50 (NB=49,38 $\pm$ 37,4), notou-se maior expressão dessa citocina no grupo D10 (NB=162,5 $\pm$ 82,6) comparado com todos os outros grupos, tratados com diacereína ou salina (DB=0; NB=11,18 $\pm$ 1,12) (Figura 11-A).

Contudo, a expressão de RNAm de IFN- γ nas ilhotas, mostrou-se aumentada nos grupos D5 (NB=53,8 $\pm$ 10,8) e D50 (NB= 37,9 $\pm$ 0,1) comparados ao grupo Salina (DB=0; NB=4,86 $\pm$ 0,56) e com o grupo D10 (NB=8,45 $\pm$ 2,8) (Figura 11-B).

Analizando a expressão de IL-12, verificou-se aumento na expressão de RNAm nas ilhotas dos grupos D5 (NB=111,9 $\pm$ 6,49), D10 (NB=140,9 $\pm$ 35,3) e D50 (NB=125,1 $\pm$ 2,69) comparados ao grupo Salina (DB=175,0 $\pm$ 10,7; NB=30,2 $\pm$ 2,7), porém entre esses grupos tratados com diacereína, não houve diferença na expressão (Figura 11-C). A expressão do RNAm de TNF- α foi aumentada em todos os grupos tratados com diacereína (D5-NB=197 $\pm$ 13,53; D10-NB=205,6 $\pm$ 85,4; D50-NB=163,3 $\pm$ 21,48) quando comparados ao grupo salina (DB=0; NB=18,7 $\pm$ 1,98), contudo sem diferenças entre as doses de diacereína (Figura 11-D).

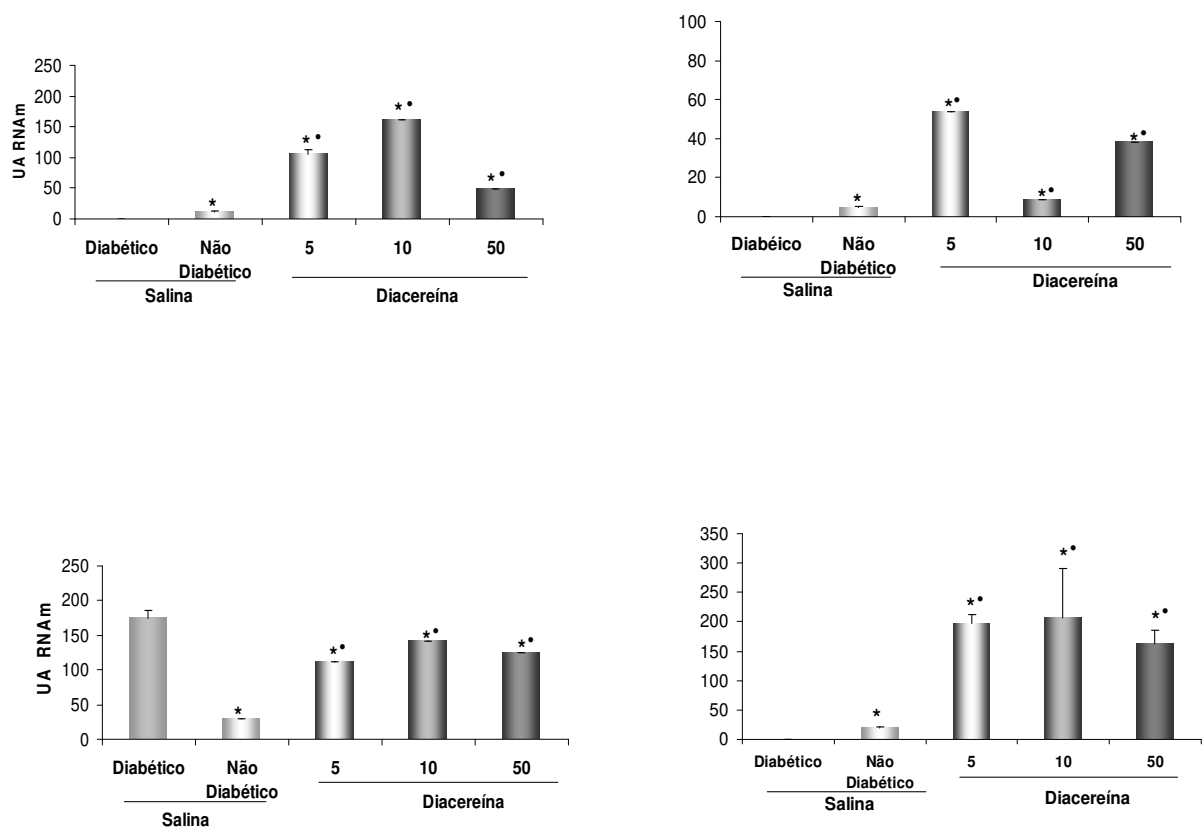


Figura 11- Expressão do mRNA das citocinas IL-1 β (A), IFN- γ (B), IL-12 (C) e TNF- α (D), em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD tratados com diferentes concentrações de diacereína e Salina. Para a análise estatística, foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.

(*) Comparação entre todos os grupos tratados com diacereína com ilhotas de animais diabéticos do grupo salina.

(•) Comparação entre todos os grupos tratados com diacereína com ilhotas de animais não diabéticos do grupo salina.

4.5- Efeitos da administração de diacereína nas diferentes concentrações sobre a expressão sérica de citocinas

A expressão sérica de IL-1 β foi significativamente menor nos grupos D5 (DB=0,15 $\pm$ 0,03; NB=0,18 $\pm$ 0,02; $p<0,01$) e D10 (DB=0,16 $\pm$ 0,07; NB=0,18 $\pm$ 0,08; $p<0,01$) comparados aos grupos Salina (DB=1,88 $\pm$ 1,6; NB=3,7 $\pm$ 1) e D50 (DB=1,05 $\pm$ 0,81; NB=1,86 $\pm$ 0,3). Entretanto, a análise dos níveis séricos desta citocina entre os animais de cada grupo separadamente, somente o grupo D50 apresentou diferença significativa, sendo menor nos animais diabéticos (Figura 12-A).

IFN- γ circulante nos animais tratados com salina e diacereína, mostrou-se aumentado significativamente no grupo D50 (DB=660,0 $\pm$ 58,0; NB=628,3 $\pm$ 66,1; $p<0,01$) comparado aos demais grupos. Houve expressão significativamente menor no grupo D10 (DB=9,0 $\pm$ 2,0; NB=8,4 $\pm$ 1,2; $p<0,01$) comparando com o grupo Salina (DB= 30,7 $\pm$ 27,3; NB=27,1 $\pm$ 3,6), e no grupo D5 (NB=16,6 $\pm$ 7,4) somente nos animais não diabéticos (Figura 11-B).

Os níveis séricos de IL-12 mostraram-se diminuídos de maneira significativa nos grupos D5 (DB=48,7 $\pm$ 36,4; NB=53,8 $\pm$ 20,4; $p<0,01$) e D10 (DB=23,7 $\pm$ 10,6; NB=31,6 $\pm$ 16,16; $p<0,01$) comparados ao grupo Salina (DB=129,3 $\pm$ 97,6; NB=140,3 $\pm$ 63,6). Não houve diferença significativa no grupo D50. Também não houve diferença significativa entre os animais diabéticos e não diabéticos de cada grupo isolado (Figura 12-C).

Os níveis séricos de TNF- α mostraram-se diminuídos significativamente nos animais dos grupos D5 (DB=0,193 $\pm$ 0,06; NB=0,156 $\pm$ 0,02; $p<0,01$) e D10 (DB= 0,216 $\pm$ 0,03; NB=0,135 $\pm$ 0,03; $p<0,01$) comparados ao grupo Salina (DB=1,77 $\pm$ 1,14; NB=2,18 $\pm$ 0,58). Considerando separadamente os animais de cada grupo, foi verificada diminuição significativa de TNF nos animais não diabéticos dos grupos D10 ($p<0,05$) e D50 (NB=0,305 $\pm$ 0,23; $p<0,01$) comparados aos animais diabéticos (Figura 12-D).

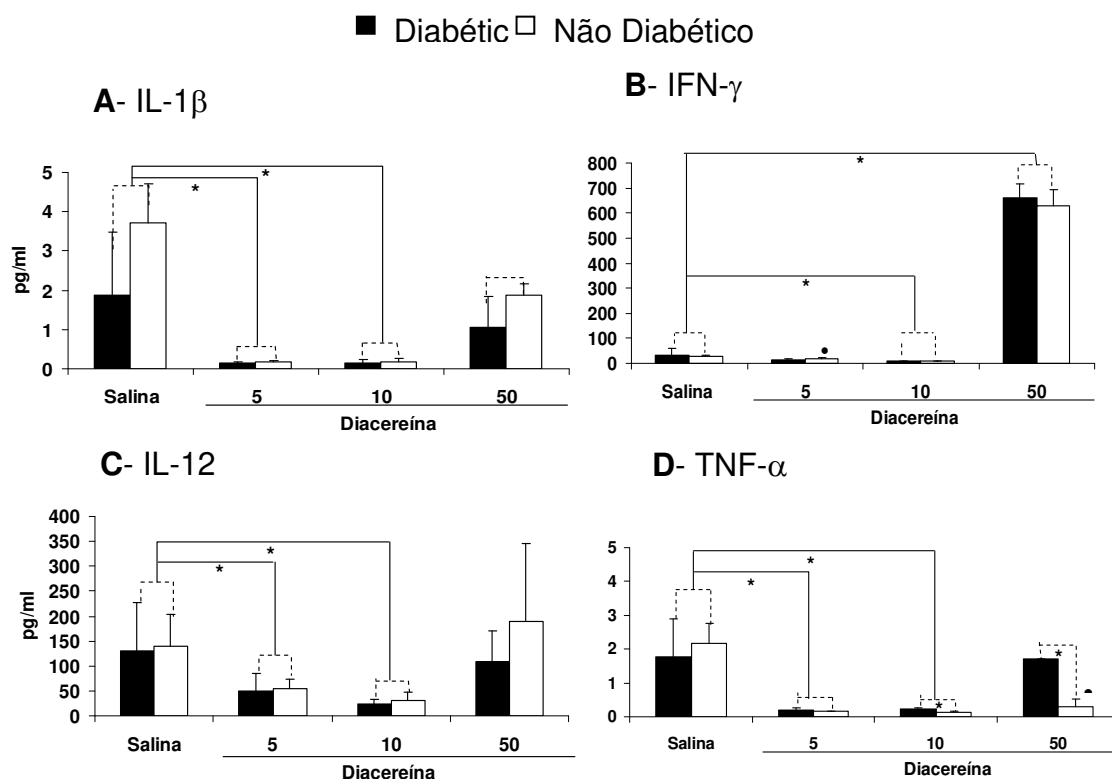


Figura 12- Concentração de citocinas IL-1 β (A), IFN- γ (B), IL-12 (C) e TNF- α (D), no soro de camundongos NOD tratados com diferentes concentrações de diacereína e Salina. Para a análise estatística, foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$. (*) Comparação entre todo o grupo em questão com todo o grupo salina. (----*) Comparação entre diabéticos e Não diabéticos do mesmo grupo. (●) Comparação entre grupo em questão com o grupo salina, separadamente diabéticos e/ou não diabéticos.

4.6- Imunohistoquímica

A identificação da população de infiltrado celular pela imunohistoquímica mostrou a presença de linfócitos T CD4, CD8 e CD11 principalmente nos animais diabéticos do grupo tratado com salina (Figura 13).

Todos os grupos tratados com diacereína apresentaram maior marcação de infiltrado celular quando comparados ao grupo controle. O grupo D5 tanto nos animais diabéticos como nos não diabéticos, apresentou linfócitos T CD4, CD8 e macrófagos (CD11), porém em maior quantidade nos animais não diabéticos (Figura 14) sugerindo desestruturação da celularidade das ilhotas e, conseqüentemente, os resultados obtidos dos índices de infiltração e destruição das ilhotas.

Os animais não diabéticos do grupo D10 apresentaram infiltração mais intensa desses linfócitos e chama atenção, a predominância de macrófagos neste grupo comparado ao grupo diabético (Figura 15).

O grupo D50 apresentou presença dos linfócitos semelhante ao grupo D5, estando combinados com a infiltração celular e destruição mostrada anteriormente (Figura 16).

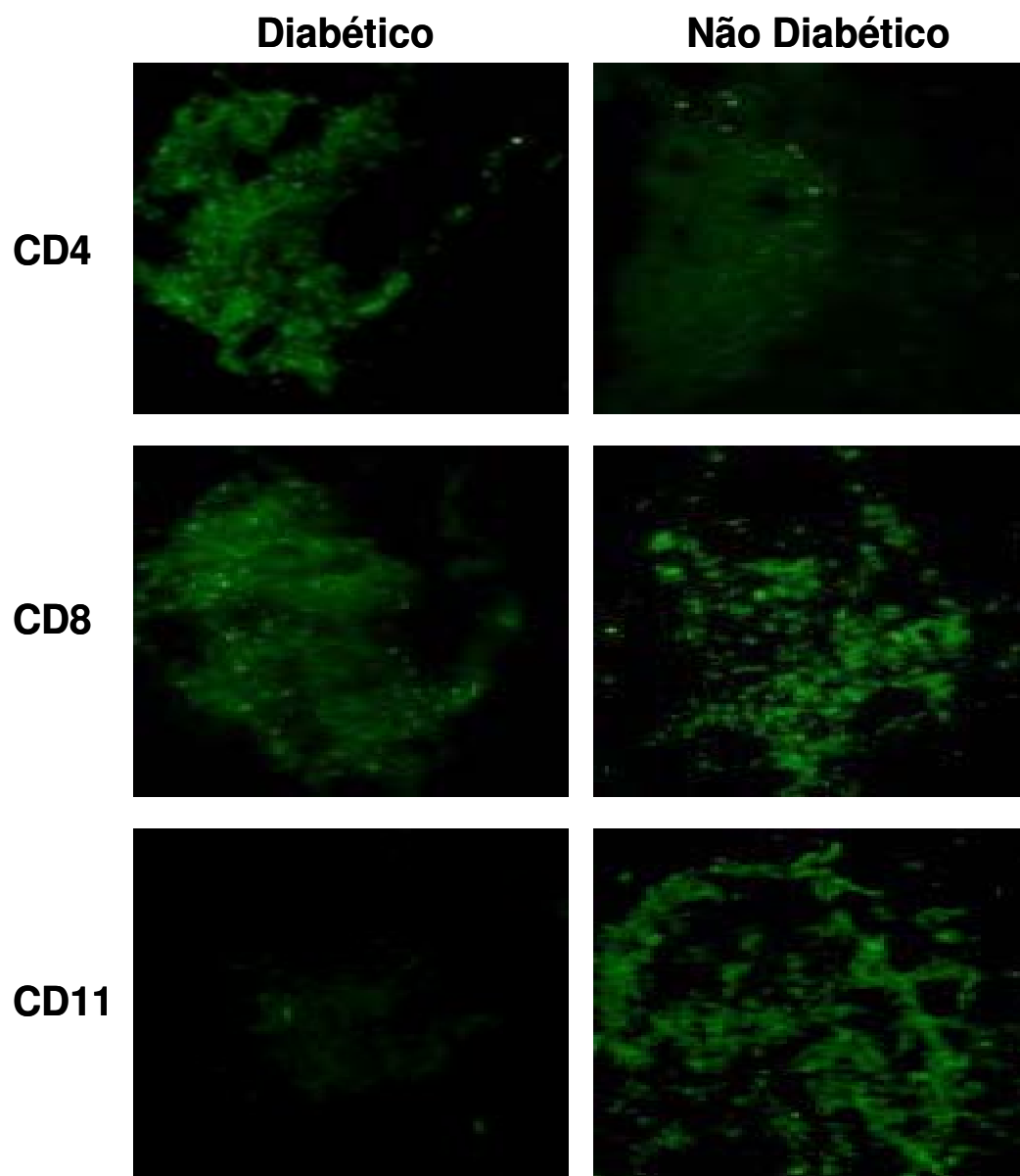


Figura 13- Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas submetidas a imunohistoquímica para detecção de linfócitos T CD4, CD8 e CD11 (macrófagos) em ilhotas β pancreáticas de camundongos NOD do grupo Salina.

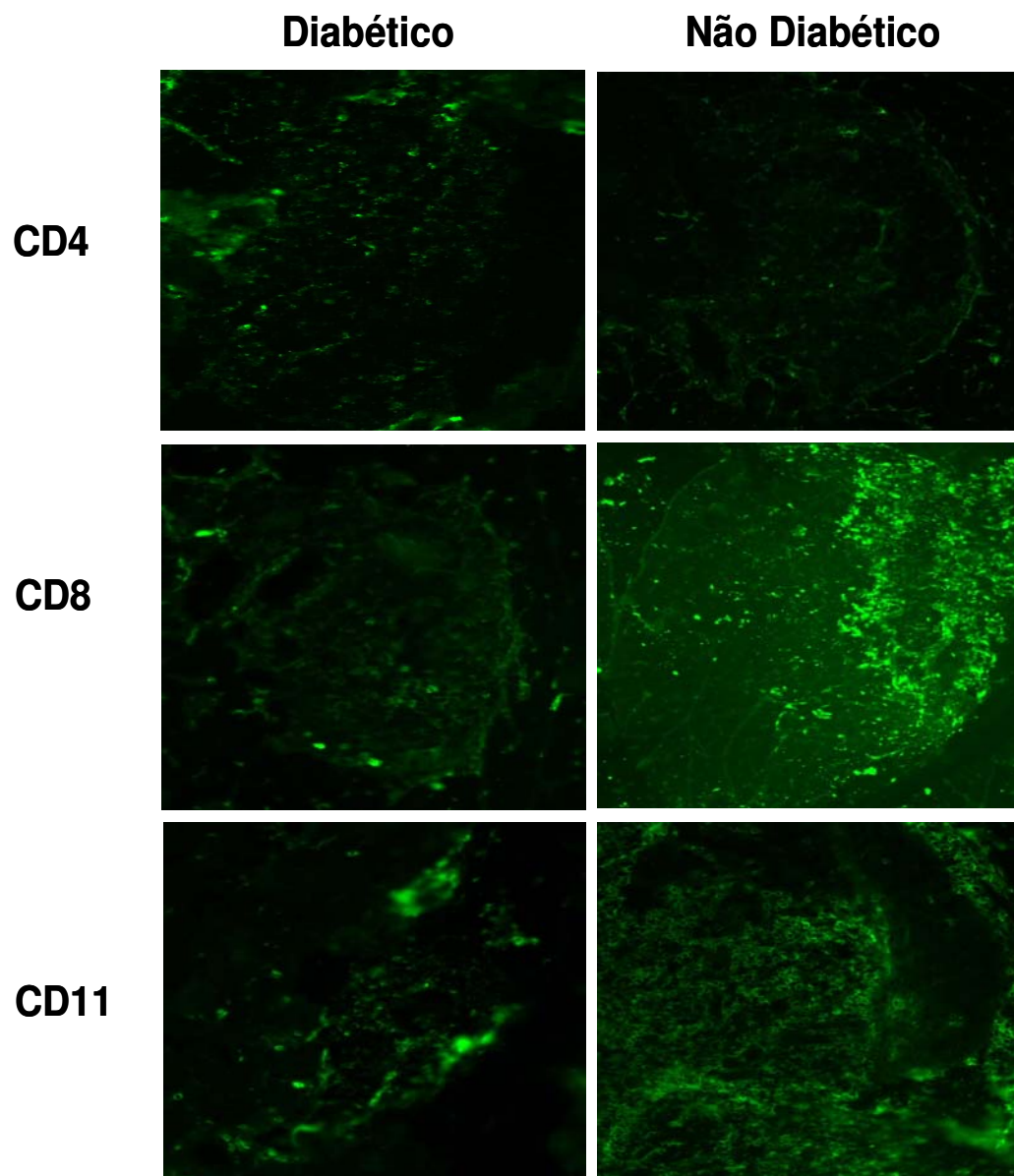


Figura 14- Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas submetidas a imunohistoquímica para detecção de linfócitos T CD4, CD8 e CD11 (macrófagos) em ilhotas β pancreáticas de camundongos NOD do grupo D5.

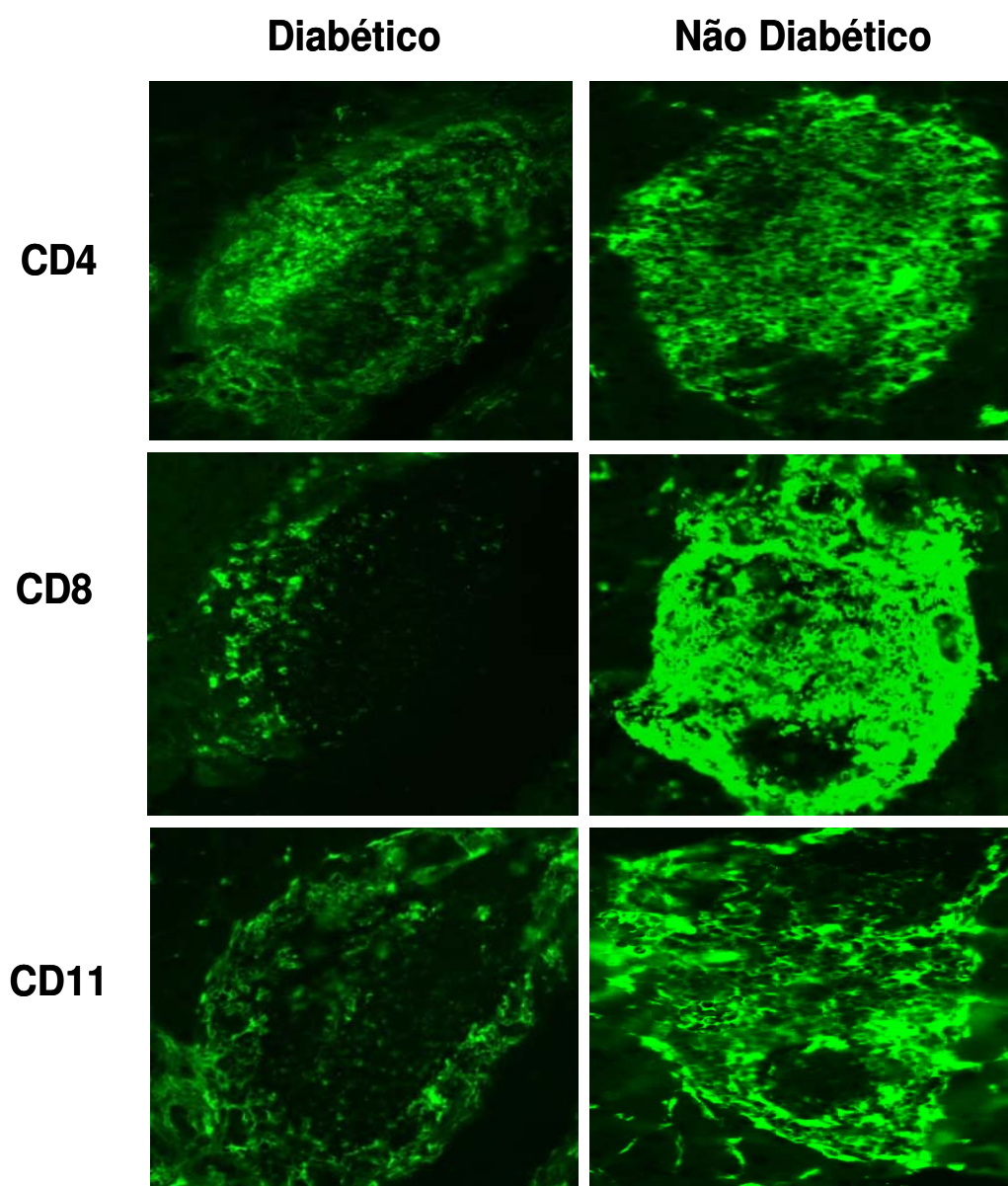


Figura 15- Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas submetidas a imunohistoquímica para detecção de linfócitos T CD4, CD8 e CD11 (macrófagos) em ilhotas β pancreáticas de camundongos NOD do grupo D10.

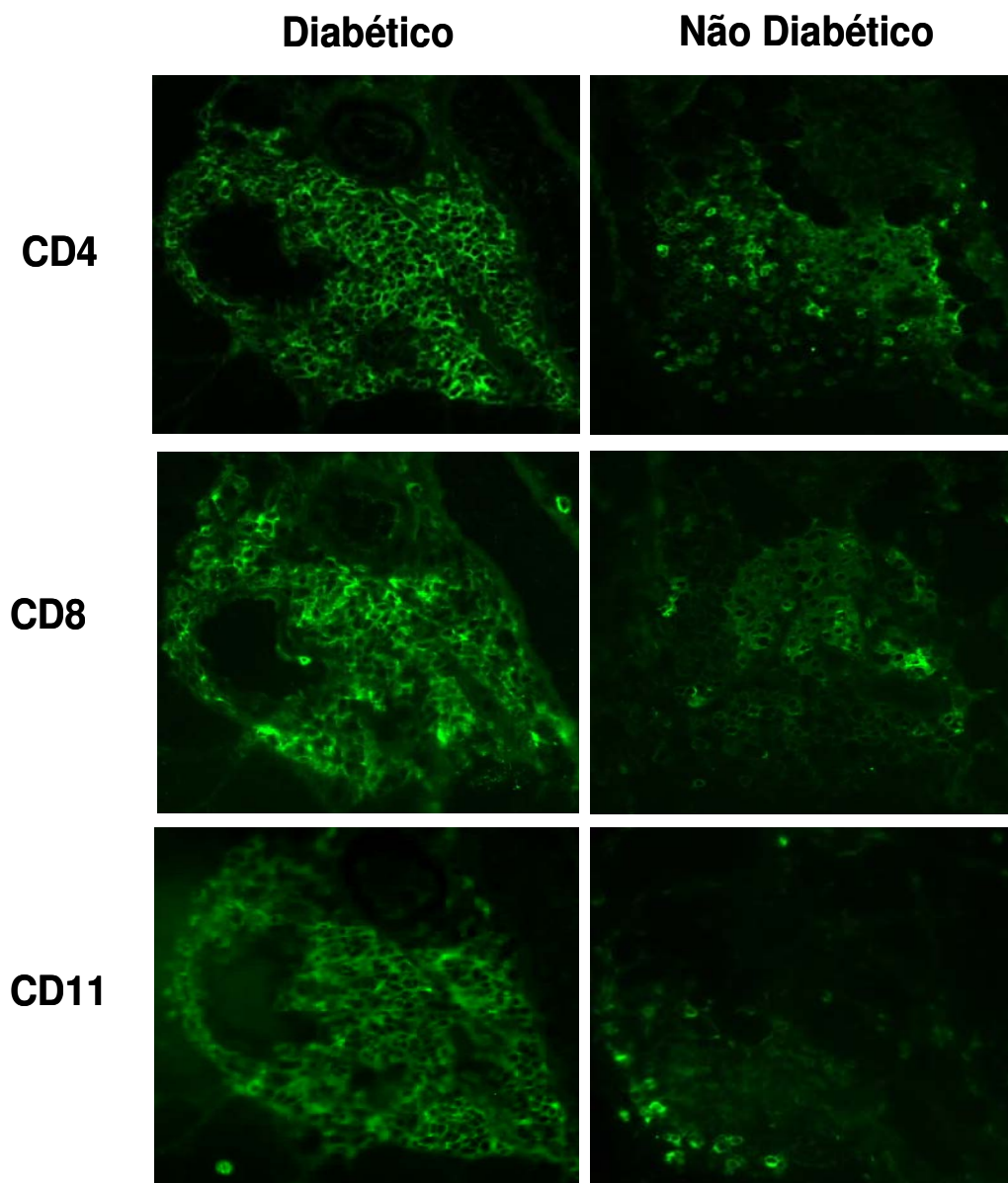


Figura 16- Fotomicrografias de ilhotas pancreáticas submetidas a Imunohistoquímica para detecção de linfócitos T CD4, CD8 e CD11 (macrófagos) em ilhotas β pancreáticas de camundongos NOD do grupo D50.

5- DISCUSSÃO

Grande parte do conhecimento do processo de lesão do pâncreas no DM-1 está fundamentada em estudos realizados com camundongos da linhagem NOD. Este modelo tem fornecido subsídios importantes no entendimento de mecanismos imune reguladores e para o desenvolvimento de novas terapias [11, 80] Essas terapias para o DM-1 são baseadas na intervenção sobre o sistema imunológico, sendo promissoras para impedir a instalação ou evolução da doença. Assim, o estudo de substâncias com propriedades imunomodulatórias tem atraído o interesse de vários grupos de pesquisa [82]. Dessa forma, utilizamos como foco de estudo, a diacereína, por ser uma droga com propriedades antiinflamatórias e por ser principalmente um inibidor de IL-1 β .

O objetivo do presente estudo foi investigar as propriedades antiinflamatórias da diacereína e seu possível efeito sobre o diabetes tipo 1. Nossos resultados mostraram que a administração diária dessa droga, pode modificar a incidência do diabetes mellitus autoimune espontâneo nos animais tratados, reduzindo o número de animais diabéticos e expressando mais tardiamente a doença, contrastando com os animais que receberam solução salina. O cálculo de razão de chances, indicou o favorecimento do tratamento com diacereína em relação à doença.

A classificação histológica das alterações morfológicas encontradas no DM-1 espontâneo em camundongos NOD, relatando a proporção de ilhotas em diferentes graus de invasão celular, foi descrito por SIGNORE e colaboradores [75] e adaptado VENTURA-OLIVEIRA [22]. A análise do infiltrado celular nas ilhotas, mostrou que os animais tratados com diacereína tiveram menor invasão celular e quanto maior a dosagem, menor a desestruturação das ilhotas de animais não diabéticos. Apesar de não realizarmos protocolos para a quantificação da população do infiltrado celular, este evento poderia estar relacionado à quantidade de macrófagos. Contudo, este resultado contradiz a expressão gênica de IL-12 que apresentou-se aumentada no grupo tratado com maior dosagem de diacereína e menor quantidade de macrófagos.

Para verificar a presença de diacereína no soro e pâncreas dos animais tratados, foi feito HPLC, como descrito anteriormente, baseado em trabalhos__prévios, que demonstraram a presença [74] e a estabilidade [82] da diacereína e seu metabólito ativo,

através da análise qualitativa por HPLC de urina e plasma de ratos. Os resultados de HPLC qualitativos aqui apresentados estão em concordância com estes estudos. Adicionalmente, a identificação da diacereína no pâncreas é inédita e poderá fornecer subsídios adicionais ao entendimento da ação da droga potencialmente modulando a inflamação no órgão.

No diabetes autoimune, a participação de citocinas pró inflamatória como IL-1 β , IL12, IFN γ e TNF α na destruição das células β no DM-1 autoimune estão bem fundamentados [22, 46, 83]. Recentemente, NARANG e colaboradores[55] demonstraram o processo pelo (s) qual(s) ocorre a destruição das células das ilhotas. Inicialmente a citocina IL-1 β ativa seu receptor antagonista (IL-1ra), o qual inicia a cascata de eventos bioquímicos intracelulares. Esses efeitos são potencializados pelo TNF- α e IFN- γ e esse caminho é conduzido pela ativação do NF κ B, que induz a expressão do iNOS, liberando NO, causando assim a disfunção e morte das ilhotas. As principais propriedades atribuídas á diacereína é a inibição da síntese de citocinas pró-infamatórias, como IL-1 β e TNF- α [65]. PELLETIER [84] também demonstrou que a IL-1 β pode aumentar a produção de NO e que a diacereína e a reína podem diminuir a produção desse radical livre.

Nossos resultados referentes à expressão gênica de células esplênicas, demonstraram aumento de IL-1 β e IL-12, porém diminuição de TNF- α . Quanto à expressão de IFN- γ , somente houve diferença significativa no grupo de menor dosagem, sendo esta diminuída.

Em relação à expressão gênica de ilhotas pancreáticas, houve aumento de todas as citocinas pró-inflamatórias sem exceção. Porém, a concentração sérica dessas citocinas apresentou-se reduzidas, sugerindo bloqueio pós-transcricional.

O aumento da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias principalmente IL-12 nos grupos tratados com diacereína comparados ao grupo tratado com salina, pode estar relacionado à grande quantidade de macrófagos demonstrada pela imunohistoquímica, como dito anteriormente, já que esse tipo celular é responsável pela secreção dessa citocina, iniciando a cascata inflamatória.

MARTEL-PELLETIER e colaboradores [85] descreveram o efeito da diacereína e reína na IL-1 β na tradução e pós-tradução, podendo causar a inibição na produção do gene de IL-1 β . O NF- κ B promove a transcrição do RNAm de citocinas pró-inflamatórias, e promove a entrada no ciclo celular [86], porém a diacereína inibe a produção do NF- κ B, inibindo a síntese de iNOS [67]. É possível que a diacereína exerça função semelhante na modulação da expressão do TNF. Contudo, serão precisos experimentos adicionais para confirmação desta hipótese.

PELLETIER [87] demonstrou que a diacereína reduz os níveis de apoptose por condrócitos através da redução nos níveis de iNOS pela droga, indicando que a diacereína tem potencial efeito a nível pós-transcricional.

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro dos animais, foram diminuídos nos grupos tratados com diacereína em relação ao grupo salina, exceto IFN- γ , o qual foi aumentado no grupo D50. Isso sugere que a diacereína interfere no processo pós-transcricional, pois observou-se aumento na expressão gênica dessas citocinas pró-inflamatórias estudadas e redução dos níveis no plasma, sugerindo propriedades inibitórias pós-transcricional.

Alguns mecanismos estudados procuram explicar os efeitos citotóxicos das citocinas, como por exemplo, a produção de NO, que induz a lise das células das ilhotas levando a lesão do DNA, acarretando sua destruição [20, 37, 43, 48]. Assim, pode-se sugerir que a destruição das células β ocorre por apoptose. A IL-1 β induz apoptose por meio da liberação de radicais livres como NO [89]. A citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8, uma das principais formas de destruição das ilhotas pancreáticas, do mesmo modo se realiza por meio do óxido nítrico, mediando a apoptose [90]. Neste contexto, foi descrito que a diacereína inibe a produção de NO, a quimiotaxia [91] e a atividade fagocítica [92].

Subpopulações de linfócitos T associados a insulite foram inicialmente caracterizadas por KIKUTANI e MAKINO [6]. Wong e colaboradores[93], descreveram as propriedades de linfócitos CD4+ e CD8+ na insulite e o desenvolvimento do Diabetes. Outras células, como macrófagos, linfócitos B e células NK no infiltrado inflamatório, associado a destruição de células beta foram descritas [94]. Os resultados obtidos

provenientes dos ensaios de fenotipificação do infiltrado inflamatório mostraram a presença de linfócitos CD4+, CD8+ e principalmente de macrófagos, nas ilhotas de todos os grupos experimentais, diabéticos e não diabéticos.

Embora não tenha sido realizado nenhum ensaio específico no presente trabalho para avaliar a ocorrência de apoptose celular, sabe-se que a mesma é freqüente no processo inflamatório. Está bem determinado a participação de caspases na morte celular programada[88]. A diacereína inibe a atividade da caspase C-3, reduzindo assim a ocorrência deste evento[87].

Os conjuntos dos resultados sugerem que a diacereína interferiu na incidência do diabetes e modulando a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-12. Adicionalmente, a identificação de diacereína no pâncreas dos animais tratados abre novas perspectivas de pesquisas quanto às suas propriedades farmacológicas.

6- CONCLUSÕES

- 1- A análise qualitativa, através do HPLC, permitiu identificar a presença de diacereína no pâncreas e soro dos animais tratados, confirmando a absorção da droga pelo tecido.
- 2- A diacereína na dose de 10mg/kg/dia foi capaz de minimizar o grau de insulite nos animais não diabéticos.
- 3- A incidência do diabetes foi menor nos animais tratados com diacereína, principalmente no grupo tratado com 10mg/kg/dia.
- 4- Os resultados obtidos sugerem que a diacereína interfere no processo pós-transcricional, pois foi observado aumento na expressão gênica de todas as citocinas pró-inflamatórias estudadas (IL-1 β , IFN- γ , IL-12 e TNF- α), e diminuição dos níveis séricos sugerindo ação de bloqueio pós-transcricional da diacereína.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7):539-53.
- [2] The expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2002.
- [3] Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2006 Mar 11;367(9513):847-58.
- [4] Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986 May 22;314(21):1360-8.
- [5] WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. *World Health Organization.* 1999;1:3.
- [6] Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol.* 1992;51:285-322.
- [7] Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* 1974 Nov 30;2(7892):1279-83.
- [8] Palmer JP, Cooney MK, Crossley JR, Hollander PH, Asplin CM. Antibodies to viruses and to pancreatic islets in nondiabetic and insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care.* 1981 Sep-Oct;4(5):525-8.
- [9] Rossini AA, Greiner DL, Friedman HP, Mordes JP. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* 1993;1:46-75.
- [10] Schwartz RH. Immunological tolerance. In: PAUL, WE> Fundamental Immunology. New York, Raven Press. 1993:677-731.
- [11] Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev.* 1994 Aug;15(4):516-42.
- [12] Bach JF, Mathis D. The NOD mouse. *Res Immunol.* 1997 Jun;148(5):285-6.

- [13] Lafferty KJ. Immunobiology of autoimmune diabetes. *Res Immunol.* 1997 Jun;148(5):313-9.
- [14] Nepom GT, Erlich H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:493-525.
- [15] Atkinson MA. Molecular mimicry and the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus: still just an attractive hypothesis. *Ann Med.* 1997 Oct;29(5):393-9.
- [16] Corbett JA, Wang JL, Misko TP, Zhao W, Hickey WF, McDaniel ML. Nitric oxide mediates IL-1 beta-induced islet dysfunction and destruction: prevention by dexamethasone. *Autoimmunity.* 1993;15(2):145-53.
- [17] Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, et al. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity.* 1994;19(3):169-78.
- [18] Eizirik DL, Delaney CA, Green MH, Cunningham JM, Thorpe JR, Pipeleers DG, et al. Nitric oxide donors decrease the function and survival of human pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol.* 1996 Apr 19;118(1-2):71-83.
- [19] Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, et al. Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. *Diabetologia.* 1996 May;39(5):530-6.
- [20] Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1998 Jun;14(2):129-51.
- [21] Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Evidence that beta cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. *J Immunol.* 1999 Aug 1;163(3):1562-9.
- [22] Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Nov;35(11):1347-55.

- [23] 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.
- [24] Pavin EJ, Zollner RL. Implantação da linhagem "NOD-mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. *Arq Bras Endo Metabol* 1994;38:105-8.
- [25] Bowman MA, Leiter EH, Atkinson MA. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. *Immunol Today*. 1994 Mar;15(3):115-20.
- [26] Singh B, Rabinovitch A. Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. *Autoimmunity*. 1993;15(3):209-13.
- [27] Tochino Y. The NOD mouse as a model of type I diabetes. *Crit Rev Immunol*. 1987;8(1):49-81.
- [28] Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am J Physiol*. 1992 Oct;263(4 Pt 1):E607-14.
- [29] Many MC, Maniratunga S, Denef JF. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1996;104 Suppl 3:17-20.
- [30] Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A, Soliven B, et al. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med*. 2001 Sep 3;194(5):677-84.
- [31] Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:447-85.

- [32] Greeley SA, Katsumata M, Yu L, Eisenbarth GS, Moore DJ, Goodarzi H, et al. Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Med*. 2002 Apr;8(4):399-402.
- [33] Wang B, Gonzalez A, Benoist C, Mathis D. The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol*. 1996 Aug;26(8):1762-9.
- [34] Young DL, Ramanujan S, Kreuwel HT, Whiting CC, Gadkar KG, Shoda LK. Mechanisms mediating anti-CD3 antibody efficacy: insights from a mathematical model of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1079:369-73.
- [35] Gong Z, Jin Y, Zhang Y. Suppression of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice by oral administration of a cholera toxin B subunit-insulin B chain fusion protein vaccine produced in silkworm. *Vaccine*. 2006 Nov 3.
- [36] Reddy S, Chang M, Robinson E. Young NOD mice show increased diabetes sensitivity to low doses of streptozotocin. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1079:109-13.
- [37] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*. 1998 Apr 15;55(8):1139-49.
- [38] Hartemann-Heurtier A, Richard MF, Boitard C. Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol*. 1999 May;116(2):225-30.
- [39] Campbell IL, Iscario A, Harrison LC. IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol*. 1988 Oct 1;141(7):2325-9.
- [40] Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A. Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1. *Diabetes*. 1988 Jan;37(1):133-6.

- [41] Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krah T, Patstone G, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2511-20.
- [42] Gurlo T, Kawamura K, von Grafenstein H. Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *J Immunol*. 1999 Dec 1;163(11):5770-80.
- [43] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shi Y, Morgan AR, Bleackley RC. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia*. 1994 Aug;37(8):733-8.
- [44] Toyoda H, Formby B, Magalong D, Redford A, Chan E, Takei S, et al. In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett*. 1994 Mar;39(3):283-8.
- [45] Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, et al. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulitis characterized by diminished inraislelet interferon-gamma transcription. *J Clin Invest*. 1995 Feb;95(2):628-34.
- [46] Hirai H, Kaino Y, Ito T, Kida K. Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets of nonobese diabetic mice. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000 Jan;13(1):91-8.
- [47] Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, McIntyre B, Gregory A, et al. Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature*. 1990 Aug 30;346(6287):844-7.
- [48] Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes*. 2002 Feb;51(2):311-6.
- [49] Yamada K, Takane-Gyotoku N, Yuan X, Ichikawa F, Inada C, Nonaka K. Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. *Diabetologia*. 1996 Nov;39(11):1306-12.

- [50] Suarez-Pinzon W, Sorensen O, Bleackley RC, Elliott JF, Rajotte RV, Rabinovitch A. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes*. 1999 Jan;48(1):21-8.
- [51] Ingelsson E, Saldeen J, Welsh N. Islet expression of perforin, Fas/Apo-1 and interleukin-1 converting enzyme (ICE) in non-obese diabetic (NOD) mice. *Immunol Lett*. 1998 Oct;63(3):125-9.
- [52] Thomas HE, Kay TW. Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000 Jul-Aug;16(4):251-61.
- [53] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*. 2003 Sep;4(3):291-9.
- [54] La Cava A, Alviggi C, Matarese G. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J Mol Med*. 2004 Jan;82(1):4-11.
- [55] Narang AS, Sabek O, Gaber AO, Mahato RI. Co-expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 receptor antagonist improves human islet survival and function. *Pharm Res*. 2006 Sep;23(9):1970-82.
- [56] Pomarelli P, Berti M, Gatti MT, Mosconi P. A non steroidal anti-inflammatory drug that stimulates prostaglandin release. *Farmaco [Sci]*. 1980 Oct;35(10):836-42.
- [57] Mian M, Benetti D, Rosini S, Fantozzi R. Effects of diacerein on the quantity and phagocytic activity of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages. *Pharmacology*. 1989;39(6):362-6.
- [58] Kay AG, Griffiths LG, Volans GN, Grahame R. Preliminary experience with diacetylrrhein in the treatment of osteoarthritis. *Curr Med Res Opin*. 1980;6(8):548-51.
- [59] Spencer CM, Wilde MI. Diacerein. *Drugs*. 1997 Jan;53(1):98-106; discussion 7-8.

- [60] Nguyen M, Dougados M, Berdah L, Amor B. Diacerhein in the treatment of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum*. 1994 Apr;37(4):529-36.
- [61] Pelletier JP, Yaron M, Haraoui B, Cohen P, Nahir MA, Choquette D, et al. Efficacy and safety of diacerein in osteoarthritis of the knee: a double-blind, placebo-controlled trial. The Diacerein Study Group. *Arthritis Rheum*. 2000 Oct;43(10):2339-48.
- [62] Debord P, Louchahi K, Tod M, Cournot A, Perret G, Petitjean O. Influence of renal function on the pharmacokinetics of diacerein after a single oral dose. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1994 Jan-Mar;19(1):13-9.
- [63] Moore AR, Greenslade KJ, Alam CA, Willoughby DA. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998 Jan;6(1):19-23.
- [64] Tamura T, Ohmori K. Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol*. 2001 May 11;419(2-3):269-74.
- [65] Pelletier JP, Lajeunesse D, Reboul P, Mineau F, Fernandes JC, Sabouret P, et al. Diacerein reduces the excess synthesis of bone remodeling factors by human osteoblast cells from osteoarthritic subchondral bone. *J Rheumatol*. 2001 Apr;28(4):814-24.
- [66] Hill DJ, Petrik J, Arany E, McDonald TJ, Delovitch TL. Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. *J Endocrinol*. 1999 Apr;161(1):153-65.
- [67] Mendes AF, Caramona MM, de Carvalho AP, Lopes MC. Diacerhein and rhein prevent interleukin-1beta-induced nuclear factor-kappaB activation by inhibiting the degradation of inhibitor kappaB-alpha. *Pharmacol Toxicol*. 2002 Jul;91(1):22-8.
- [68] Douni E, Sfrikakis PP, Haralambous S, Fernandes P, Kollias G. Attenuation of inflammatory polyarthritis in TNF transgenic mice by diacerein: comparative analysis with dexamethasone, methotrexate and anti-TNF protocols. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(1):R65-R72.

- [69] Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwahashi H, et al. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1997 Aug 18;186(4):613-8.
- [70] Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1999 Jan 18;189(2):347-58.
- [71] Moskalewski S. Isolation And Culture Of The Islets Of Langerhans Of The Guinea Pig. *Gen Comp Endocrinol*. 1965 Jun;44:342-53.
- [72] Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967 Jan;16(1):35-9.
- [73] Boschero AC, Delattre E, Santos ML. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. *Horm Metab Res*. 1981 Sep;13(9):531-2.
- [74] Springolo V, Coppi G. Simple method for the determination of rhein in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1988 Jun 24;428(1):173-7.
- [75] 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.
- [76] Papaccio G, Chieffi-Baccari G, Mezzogiorno V, Esposito V. Extraislet infiltration in NOD mouse pancreas: observations after immunomodulation. *Pancreas*. 1993 Jul;8(4):459-64.
- [77] Leiter P. Measuring casemix, severity, and complexity in geriatric patients undergoing rehabilitation. Small Work Group I report. *Med Care*. 1997 Jun;35(6 Suppl):JS113-7.
- [78] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.

- [79] Boechat LH, Vilella CA, Zollner RL. Effect of iodide on Fas, Fas-ligand and Bcl-w mRNA expression in thyroid of NOD mice pretreated with methimazole. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Mar;35(3):289-95.
- [80] Adorini L, Gregori S, Harrison LC. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med.* 2002 Jan;8(1):31-8.
- [81] Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S3-15.
- [82] Giannellini V, Salvatore F, Bartolucci G, Coran SA, Bambagiotti-Alberti M. A validated HPLC stability-indicating method for the determination of diacerhein in bulk drug substance. *J Pharm Biomed Anal.* 2005 Sep 15;39(3-4):776-80.
- [83] Eizirik DL, Darville MI. beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes.* 2001 Feb;50 Suppl 1:S64-9.
- [84] Pelletier JP, Mineau F, Fernandes JC, Duval N, Martel-Pelletier J. Diacerhein and rhein reduce the interleukin 1beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol.* 1998 Dec;25(12):2417-24.
- [85] Martel-Pelletier J, Mineau F, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Pelletier JP. In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. *J Rheumatol.* 1998 Apr;25(4):753-62.
- [86] Buggins AG, Milojkovic D, Arno MJ, Lea NC, Mufti GJ, Thomas NS, et al. Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways. *J Immunol.* 2001 Nov 15;167(10):6021-30.
- [87] Pelletier JP, Mineau F, Boileau C, Martel-Pelletier J. Diacerein reduces the level of cartilage chondrocyte DNA fragmentation and death in experimental dog osteoarthritic cartilage at the same time that it inhibits caspase-3 and inducible nitric oxide synthase. *Clin Exp Rheumatol.* 2003 Mar-Apr;21(2):171-7.

- [88] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.
- [89] Liu D, Pavlovic D, Chen MC, Flodstrom M, Sandler S, Eizirik DL. Cytokines induce apoptosis in beta-cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}). *Diabetes*. 2000 Jul;49(7):1116-22.
- [90] Kagi D, Odermatt B, Seiler P, Zinkernagel RM, Mak TW, Hengartner H. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1997 Oct 6;186(7):989-97.
- [91] Mian M, Azzara A, Benetti D, Ruocco L, Bertelli A, Ambrogi F. Studies in vitro on the effects of rhein on the chemotaxis of human leukocytes. *Int J Tissue React*. 1987;9(6):459-63.
- [92] Mian M, Trombi L, Rosini S, Benetti D, Caracciolo F, Carulli G, et al. Experimental studies on diacerhein: effects on the phagocytosis of neutrophil cells from subcutaneous carrageenan-induced exudate. *Drugs Exp Clin Res*. 1987;13(11):695-8.
- [93] 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.
- [94] Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C. Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *Eur J Immunol*. 1989 Oct;19(10):1947-51.

8- ANEXO

Salina		D5		D10		D50	
	DB	NB	DB	NB	DB	NB	NB
Incidência do Diabetes	75%	25%	53,33%	46,67%	40%	60%	43,4%
Índice de Lesão	0,63 ± 2,4	0,52 ± 0,10	0,47 ± 0,10*	0,53 ± 0,11	0,51 ± 0,20	0,3 ± 0,17*	0,32 ± 0,06*
Células Esplênicas							
IL-1β	25,3 ± 2,4	1,59 ± 0,6	36,8 ± 10,0	38,2 ± 6,9*	69,9 ± 7,8*	85,5 ± 15,0*	36,8 ± 16,6*
IFN-γ	15,8 ± 1,27	27,4 ± 2,7	7,5 ± 2,28*	4,0 ± 2,9*	8,26 ± 4,6*	21,9 ± 14,5*	16,2 ± 7,0
IL-12	138,1 ± 5,8	84,3 ± 9,0	89,0 ± 33,5*	98,8 ± 15,0	71,5 ± 19,0*	58,5 ± 11,5*	144,9 ± 30,4*
TNF-α	182,0 ± 10,5	90,6 ± 3,0	104,4 ± 37,3*	128,9 ± 13,3*	99,55 ± 22,5*	127,9 ± 37,0	51,8 ± 13,9*
Ilhotas							
IL-1β	0	11,18 ± 1,1*	-	105,0 ± 7,4*	-	162,5 ± 82,6*	49,38 ± 37,4*
IFN-γ	0	4,86 ± 0,56*	-	53,8 ± 10,8*	-	8,45 ± 2,8*	37,9 ± 0,1*
IL-12	175,0 ± 10,7	30,2 ± 2,7*	-	111,9 ± 6,49*	-	140,9 ± 35,3*	125,1 ± 2,69 *
TNF-α	0	18,74 ± 1,98*	-	197,9 ± 13,5*	-	205,6 ± 85,4*	163,3 ± 21,4*
ELISA							
IL-1β	1,88 ± 1,6	3,7 ± 1	0,15 ± 0,03*	0,18 ± 0,02*	0,16 ± 0,07*	0,18 ± 0,08*	1,86 ± 0,3*
IFN-γ	30,7 ± 27,3	27,1 ± 3,6	12,8 ± 5,4	16,6 ± 7,4*	9,0 ± 2,0*	8,4 ± 1,2*	628,3 ± 66,1*
IL-12	129,3 ± 97,6	140,3 ± 63,6	48,7 ± 36,4*	53,8 ± 20,4*	23,7 ± 10,6*	31,6 ± 16,16*	189,4 ± 155,0
TNF-α	1,77 ± 1,14	2,18 ± 0,58	0,193 ± 0,06*	0,156 ± 0,02*	0,216 ± 0,03*	0,135 ± 0,03*	1,72 ± 0,1 3 0305 ± 0,23* 0,