

ERRATA

Na página 5, da INTRODUÇÃO, falta, no início da mesma, a seguinte frase: auto-imunidade. Assim, a etiologia do DMID dependeria do acúmulo de fatores que...

Na página 95, da DISCUSSÃO, deve-se ler o item 5.2, da seguinte maneira:

5.2. TRATAMENTO DO DMID-CI DO CAMUNDONGO NOD COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTICD4 E ANTICD8

Na página 101, da DISCUSSÃO, falta o final do último parágrafo:

depletaram células T *in situ*, no pâncreas, e foram iniciados em presença de insulite intensa. SHIZURU et al. (1988) constatou histologicamente insulite moderada em fêmeas NOD, mantidas normoglicêmicas por 225 dias após o término de tratamento com AcMo antiCD4 (GK1.5). MAKI et al. (1992) observou, nos animais NOD em remissão clínica do DMID induzida por ALS, ilhotas pequenas ou com infiltrados periféricos, contendo, porém, grânulos com insulina. De forma similar, CHATENOUUD et al. (1994) demonstrou remissão clínica do DMID em fêmeas NOD tratadas com AcMo antiCD3 (145 2C11), apesar da presença de infiltrado insular, porém não invasivo-destrutivo, de células T CD4+ e CD8+.

WALKYRIA MARA GONÇALVES VOLPINI

9618113

**TRATAMENTO DO DIABETES AUTO-IMUNE
PRÉ-CLÍNICO DO CAMUNDONGO NOD
("non obese diabetic") EM FASE DE INSULITE
INTENSA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS
ANTICD4 E ANTICD8**

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Doutor Medicina, na área de Clínica Médica.*

Orientador: Professor Doutor Marcos A. Tambascia

CAMPINAS

1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA:
f/UNICAMP
V888t
 V. _____ Ex. _____
 TCM DO BC/ 28.632
 PROC. 667196
 C D
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 19-03-96
 N.º CPD _____
CM.00092467-7

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

Volpini, Walkyria Mara Gonçalves

V88t **Tratamento do diabetes auto-imune pré-clínico do camundongo NOD ("non obese diabetic") em fase de insulite intensa com anticorpos monoclonais antiCD4 e antiCD8 / Walkyria Mara Gonçalves Volpini. Campinas, SP : [s.n.], 1996.**

Orientador: Marcos Antonio Tambascia

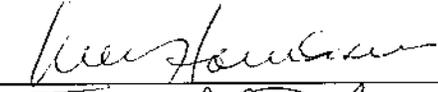
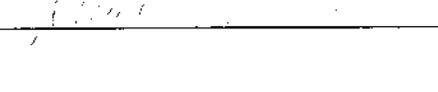
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

- 1. Diabetes Mellitus. 2. Rato como animal de laboratório. 3. Imunoterapia.
 I. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
 II. Título.**

Banca examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Professor Doutor Marcos Antonio Tambascia

Membros:

1. Prof. Dr. Marcos Antonio Tambascia - 
2. Prof. Dr. Sérgio Azeiteiro Dias - 
3. Prof. Dr. Antonio Carlos Leão - 
4. Prof. Dr. Antonio Carlos Buscheto - 
5. Prof. Dr. Lídio Augusto Veloso - 

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

Data: 27 / 08 / 96

*à meu pai (in memoriam), minha mãe e
minha irmã, alicerces de amor para a vida inteira, que me
permitem sonhar e construir o idealizado*

*à Christian (in memoriam), com quem
aprendi, na grande dor, que o caráter de um homem pode
ser medido na existência de um único dia*

Esta tese faz parte de um aprendizado contínuo em Diabetologia, área à qual dedico-me inteiramente, há dez anos. Várias pessoas e lugares compuseram minha formação científica e humana, e me estão formalmente atados. Assim, expresso todo meu agradecimento para:

Marcos Antonio Tambascia, o brilhante educador, a quem reconheço a competência em minha orientação acadêmica, e, sobretudo, a lucidez com que, oportunamente, direcionou meus estudos em Diabetologia. A dimensão deste ato extrapola os limites desta tese e se faz presente no valor que deposito em compartilhar o que me foi tão bem ensinado.

Os demais docentes da Disciplina de Endocrinologia, da UNICAMP, que participaram diretamente da minha formação: Lígia Vera Montali Assumpção e Maria Teresa Matias Baptista, a quem também devo a chance de haver realizado um estágio, em Buenos Aires, que consolidou meu interesse pela vida acadêmica.

Décio Eizirik, que, em curta permanência na UNICAMP e com a simplicidade dos grandes mestres, aportou-nos tanto conhecimento sobre o diabetes melito, a importância da pesquisa, influenciando, então, fortemente em minha opção pelo tema.

José Carlos Morelli, companheiro da Residência, cujo entusiasmo foi o impulso que me aproximou da obtenção de minha primeira bolsa de estudos.

Buenos Aires, amor à primeira vista, que me encheu de “ganas” de caminhar sobre todas as suas ruas, rompendo de vez meu sedentarismo.

Os pesquisadores José Carlos Basabe, Lidia F. Bruno, Liliana Karabatas, e demais integrantes do F.L.I.P. (“Fundacion Laboratorio de Investigaciones Pediatricas”), que me abriram as portas para o laboratório e a pesquisa experimental. Testemunho a dedicação, cuidado e carinho com que tudo me ensinaram.

Gabriel L. Roisman, que me ajudou a cruzar os oceanos: o Atlântico, e o que separa as idéias dos atos. “ Muchas gracias, che!”

Paris, beleza que embaça a alma, equilíbrio de formas, me trouxe a necessidade de harmonizar a vida para ter continuidade.

Jean-François Bach, diretor da Unidade de Pesquisa 25 do INSERM, no Hospital Necker, Paris, onde este trabalho de tese foi realizado e a quem reconheço, não apenas o acolhimento, mas a ajuda financeira para o início deste estudo.

Lucienne Chatenoud, que me recebeu em seu laboratório. Sua inteligência e seu rigor científico asseguraram o desenvolvimento deste estudo.

Jérôme Mahiou, com quem eu comparti, com grande alegria, a amizade, a mesada do laboratório e os resultados deste trabalho, que seria inviável sem sua participação.

Jacqueline Primo, Christane Ferran, Henri de Holanda Campos e Sylvie Mérite, que me ensinaram, com paciência, muita competência e bom humor, tanto a Imunologia como a França. Pela cumplicidade do dia-a-dia, de tantos fins-de semana e madrugadas, pelos êxitos de todos, pelo saber persistir, que fizeram do laboratório um lugar de desenvolvimento pessoal. Inesquecível.

Sophie Caillat-Zucman, Agnès Lehouen, Renato Monteiro, Pascal Sempé, Jean-Marie Gayet e Micheline Ferran, pela força da amizade, das discussões científicas e vitais, e do real apoio "naqueles tempos das muletas", quando eu estava pra lá de insuportável... "Merci, les amis!"

José Timsit e Étienne Larger, que me aproximaram da pesquisa aplicada, com sua indiscutível competência em Diabetologia Clínica, enriquecendo-me de posturas claras e éticas.

Maryline Calise, responsável pelo Biotério da Unidade 25 do INSERM, cujo excelente desempenho e constante colaboração foram fundamentais para este trabalho.

Antonio Ricardo Amarante, responsável pela cuidadosa assistência na análise estatística dos dados deste trabalho.

Os componentes do júri desta tese: Antonio Carlos Boschero, Lício Augusto Veloso, Sérgio Atala Dib e Antonio Carlos Lerario, por haverem aceitado revisá-la e discuti-la, e, sobretudo, por compartilharem seu conhecimento.

Marlene Dias Pinto, secretária da Pós-Graduação em Clínica Médica, pela seu desempenho atencioso e constante, e, sobretudo, pela tolerância às minhas inúmeras solicitações. Igualmente agradeço a Márcia Gnatos João, que tanto me “socorreu”, com sua organização e habilidade.

Maria Elizabeth Blois Belluso, responsável pela correção ortográfica desta tese, trabalho árduo, pois a terminologia imunológica, sobretudo moderna, é pouco utilizada, na língua portuguesa.

Os integrantes da Seção de Apoio Didático da F.C.M., a quem agradeço a enorme paciência que tiveram comigo e ao belo trabalho realizado: Renata Maia, responsável pelo editoramento desta tese e aos que participaram na parte gráfica, especialmente José Marcos de Lima Álvaro Bueno, Emilton Barbosa de Oliveira e Jefferson Espindola.

Reconheço particularmente àqueles que contribuíram à minha reintegração no País, pois, para finalizar esta tese, foi-me necessário estabelecer elos de continuidade:

À toda minha família, que “aguentou um rojão”; com tolerância e respeito: uma verdadeira obra de arte! À minha querida tia Wilma, minha eterna gratidão, pois, sem sua ajuda, tudo me seria mais difícil.

Priscila Papaiordanou, Aparecida Machado de Moraes e Belmiro Pereira, amigos da vida inteira, raros, mas sólidos como as montanhas. Imprescindíveis.

Henri, Wanda, Laise, Sílvia, Sônia, Lúcia, e o Sol do Ceará, que me acolheram, me mimaram e me salvaram! É enorme o amor que tenho por vocês.

Elizabeth João Pavin, pelo apoio permanente e a confiança, que tanto me ajudam a resistir. Sua perseverança admirável e justiça de caráter permitem a condução de um belíssimo trabalho, modificando a atenção ao ser com diabetes, no seio do H.C, UNICAMP. A seu marido, Wilton, que me doou seu tempo de sabedoria na informática, "salvando" vários gráficos desta tese.

Conceição Aparecida Vilela, tão querida, pelo caro afeto, pois com sua inteligência e um fenomenal espírito de luta, me segurou pelas mãos e tudo entendeu.

Maria Elizabeth Pelegrini e Maria Cláudia Massote, um feliz encontro profissional e humano, a quem devo o prazer de reiniciar a atividade clínica, num apaixonante trabalho em equipe.

As enfermeiras Élia, Dirce e Sonia, pela compreensão que dentro delas habita, pois quando existe vontade de trabalhar, basta um olhar.

Lígia Beatriz Persoli, cuja capacidade de abertura e inúmeros conselhos permitiram que, prontamente, pudéssemos atuar em colaboração, no Laboratório HLA-Hemocentro, genotipando nossos pacientes diabéticos. Sílvia B. D. Marques, por haver repartido comigo sua mesada e seu otimismo, e, sobretudo, seu enorme vigor para este trabalho. Os demais integrantes do laboratório, especialmente Sofia, Sandra, Simone, Sílvio, Edilaine e Marília, que me acolheram com tanto carinho.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia: Margarida, Eliene, Bárbara, Celso, Gustavo, Pinho, João Rui e Sérgio, meu enorme obrigada, pela espiritualidade, generosidade e frutíferas discussões. Ricardo L. Zollner, pela acolhida em seu espaço de trabalho.

Aos companheiros da Endócrino, Luis Henrique, Denise e Heraldo, pela força e pelos tantos conselhos dados.

Os residentes de Endocrinologia, Daniela, Marcela, Mauro e Marco Aurélio, que me estimulam de forma “que eles nem desconfiam” e pelo tanto que me ensinam. Também Sandra, Márcia e Ismair, do Laboratório de Endocrinologia, e Rose, secretária da Disciplina, pela disposição que têm demonstrado para realizar novos projetos.

Juarez Soares Costa, que move todo meu respeito, pela ajuda constante, nos dois últimos anos, nesta tarefa difícilíssima, mas factível, de “permanecer” em equilíbrio.

Reitero meu profundo respeito aos indivíduos com diabetes, que me foi possível conhecer. Eles confrontam diariamente a proposta de vida com qualidade, pela qual deveriam lutar todos os terrestres.

Esta tese foi realizada através da seguinte colaboração:

Disciplina de Endocrinologia, UNICAMP

Walkyria Mara Gonçalves Volpini

Marcos Antonio Tambascia

INSERM U-25

Jérôme Mahiu

Sylvie Merite

Jacqueline Primo

Lucienne Chatenoud

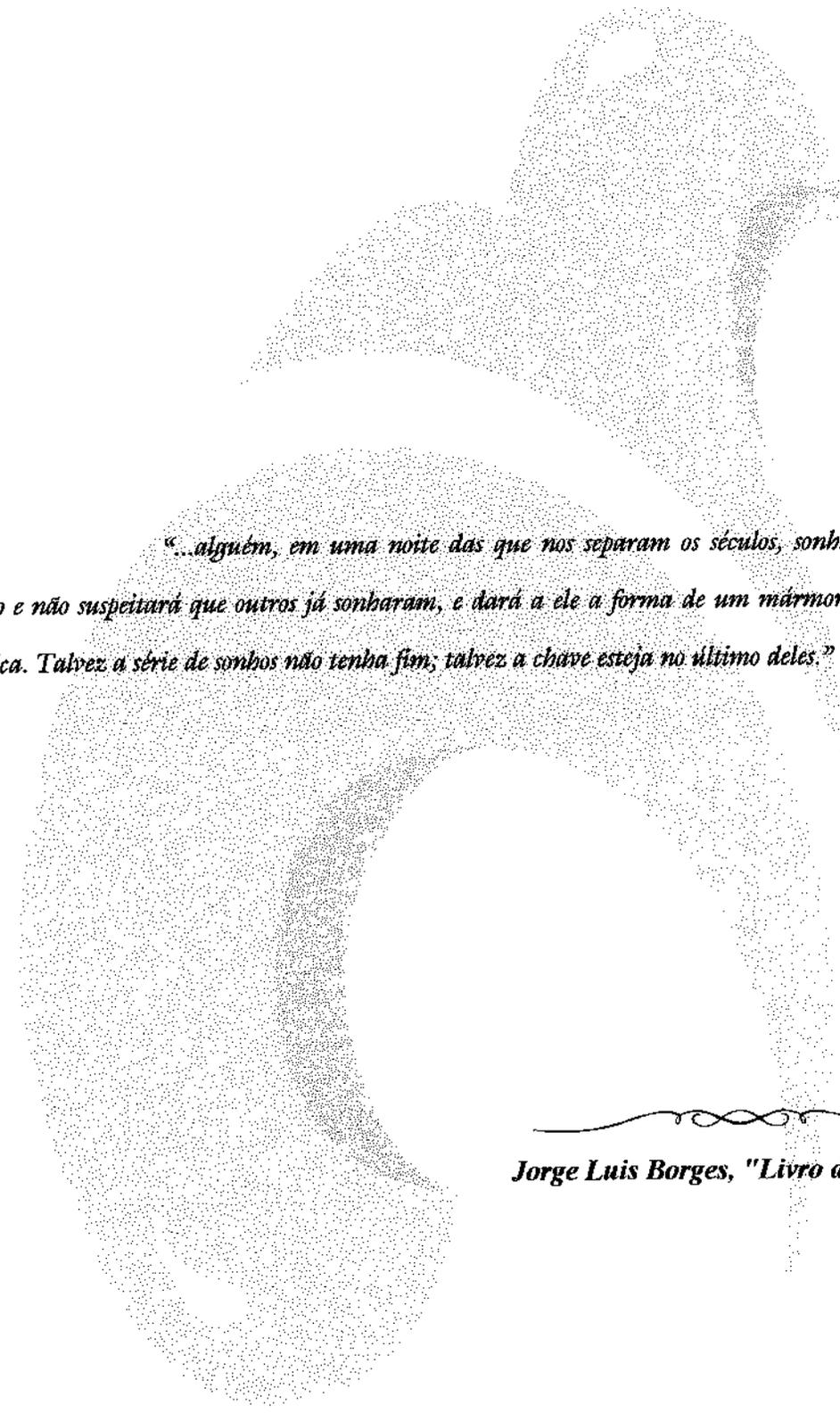
Jean-François Bach

Serviço de Anatomia Patológica, HOSPITAL NECKER, Paris

Michelle Leborgne

Michel Peuchmeur

Nicole Brousse



“...alguém, em uma noite das que nos separam os séculos, sonhará o mesmo sonho e não suspeitará que outros já sonharam, e dará a ele a forma de um mármore ou de uma música. Talvez a série de sonhos não tenha fim; talvez a chave esteja no último deles.”

Jorge Luis Borges, "Livro dos Sonhos"

NOTAÇÕES

1. O termo **DMID** (diabetes melito insulino-dependente) foi utilizado no texto como designação de diabetes de origem auto-imune.
2. Os linfócitos B e T foram denominados como **linfócitos** ou **células**, no curso do manuscrito.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	i
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Conceitos gerais.....	2
1.2. DMID: história natural de uma síndrome auto-imune.....	4
1.3. Modelos experimentais espontâneos de diabetes auto-imune.....	10
1.3.1. Camundongo NOD ("Non Obese Diabetic").....	10
1.3.1.1. Modelo de diabetes acelerado pela ciclofosfamida (DMID-CI).....	14
1.3.2. Rato BB ("Bio Breeding").....	15
1.4. As células T no diabetes auto-imune.....	18
1.4.1. Diabetes auto-imune humano.....	18
1.4.2. Camundongo NOD.....	20
1.4.2.1. Células diabetogênicas.....	20
1.4.2.2. Células reguladoras.....	22
1.4.3. Rato BB.....	23
1.4.3.1. Células diabetogênicas.....	23
1.4.3.2. Células reguladoras.....	24
1.5. Imuno-intervenção do diabetes auto-imune.....	25
1.5.1. Anticorpos monoclonais e imuno-intervenção.....	26
1.5.2. Imuno-intervenção do diabetes auto-imune humano.....	28
1.5.2.1. Imunossupressores.....	29
1.5.2.2. Imunomoduladores.....	30
1.5.3. Imuno-intervenção em modelos experimentais espontâneos de diabetes auto-imune.....	30
2. OBJETIVOS.....	32

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. Animais.....	35
3.2. Diabetes acelerado pela ciclofosfamida (DMID-CI).....	35
3.3. Anticorpos monoclonais utilizados <i>in vivo</i>	36
3.4. Imunofluorescência indireta.....	40
3.5. Histologia.....	41
3.6. Imuno-histoquímica.....	43
3.7. Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Características do diabetes acelerado pela ciclofosfamida (DMID-CI).....	46
4.1.1. Perfil e evolução do DMID-CI clínico.....	46
4.1.2. Perfil e evolução do fenótipo dos linfócitos esplênicos.....	49
A) Modelo I: 1 injeção de ciclofosfamida (CI).....	49
B) Modelo II: 2 injeções de ciclofosfamida (CI).....	50
4.1.3. Perfil e evolução da insulite: aspectos histológicos.....	51
4.1.4. Fenótipo da insulite: aspectos imuno-histoquímicos.....	62
4.2. Protocolo de tratamento do DMID-CI com anticorpos monoclonais antiCD4 e antiCD8.....	65
4.2.1. Tratamento com o AcMo depletante antiCD4 Y191.....	65
A) Efeito sobre o DMID-CI clínico.....	65
B) Efeito sobre o fenótipo dos linfócitos T esplênicos.....	66
C) Efeito sobre a insulite: aspecto histológico.....	70
D) Efeito sobre o fenótipo da insulite: imuno-histoquímica.....	72
4.2.2. Tratamento com o AcMo depletante antiCD8 Y169.....	74
A) Efeito sobre o DMID-CI clínico.....	74
B) Efeito sobre o fenótipo dos linfócitos T esplênicos.....	74
C) Efeito sobre a insulite: aspecto histológico.....	78

D) Efeito sobre o fenótipo da insulite: imuno-histoquímica.....	78
4.2.3. Aspectos gerais do tratamento com o AcMo controle anti-CD8 Y105...	80
5. DISCUSSÃO.....	83
5.1. Características do diabetes acelerado pela ciclofosfamida (DMID-CI).....	84
5.1.1. Perfil e evolução do DMID-CI clínico.....	85
5.1.2. Perfil e evolução do fenótipo dos linfócitos esplênicos.....	86
5.1.3. Perfil e evolução da insulite: aspectos histológicos.....	90
5.1.4. Fenótipo da insulite: aspectos imuno-histoquímicos.....	94
5.1.5. Conclusões.....	95
5.2. Tratamento do DMID-CI do camundongo NOD com AcMos antiCD4 e antiCD8.....	95
5.2.1. Protocolo de imuno-intervenção.....	96
5.2.2. Efeito sobre o fenótipo dos linfócitos T esplênicos.....	97
5.2.3. Efeito sobre o DMID-CI clínico.....	97
5.2.4. Efeito sobre a insulite.....	100
5.2.5. Mecanismos de ação dos AcMos antiCD4 e antiCD8 no tratamento do DMID-CI do camundongo NOD.....	102
5.2.5.1. AcMo antiCD4.....	103
5.2.5.2. AcMo antiCD8.....	106
5.2.6. Perspectivas.....	109
6. CONCLUSÕES.....	112
7. SUMMARY.....	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS	Pág.
<u>Figura 1</u> : Mecanismos de desenvolvimento de auto-reatividade anticélula β pancreática, no diabetes auto-imune.....	8
<u>Figura 2</u> : Suscetibilidade poligênica ao diabetes auto-imune, no camundongo NOD..	13
<u>Figura 3</u> : Mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais anticélulas T.....	27
<u>Figura 4</u> : Teste biológico para pesquisa da dose ideal, <i>in vivo</i> , do AcMo antiCD4 depletante Y191.....	38
<u>Figura 5</u> : Frequência do DMID clínico, em camundongos NOD, no Modelo I: uma injeção de ciclofosfamida (CI).....	47
<u>Figura 6</u> : Frequência do DMID clínico, em camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI).....	48
<u>Figura 7</u> : % de Linfócitos B (A) e T (B) esplênicos, de camundongos NOD, no Modelo I: uma injeção de ciclofosfamida (CI).....	52
<u>Figura 8</u> : % de Linfócitos B (A) e T (B) esplênicos, de camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI).....	53
<u>Figura 9</u> : Subpopulações T CD4+ e CD8+, em baço, de camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI).....	54
<u>Figura 10</u> : Marcação, por imunofluorescência, dos esplenócitos de camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI).....	55
<u>Figura 11</u> : Estadiamento da insulite em camundongos NOD.....	56
<u>Figura 12</u> : Perfil da insulite, em camundongos NOD, no Modelo I: uma injeção de ciclofosfamida (CI).....	58

<u>Figura 13:</u> Perfil da insulite, em camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI).....	59
<u>Figura 14:</u> Perfil da insulite espontânea em NOD fêmeas (A) e machos (B).....	61
<u>Figura 15:</u> Análise histológica e imuno-histoquímica da insulite, induzida por ciclofosfamida, em camundongos NOD.....	63
<u>Figura 16:</u> Subpopulações T CD4+ e CD8+ em diferentes estádios da insulite, induzida por ciclofosfamida, em camundongos NOD.....	64
<u>Figura 17:</u> Tratamento do DMID-CI clínico, do camundongo NOD, com AcMo antiCD4 depletante Y191.....	67
<u>Figura 18:</u> Efeito do tratamento com o AcMo antiCD4 depletante Y191 sobre o fenótipo das subpopulações T esplênicas CD4+ e CD8+.....	68
<u>Figura 19:</u> Marcação por imunofluorescência dos esplenócitos T de camundongos NOD, tratados com o AcMo antiCD4 depletante Y191.....	69
<u>Figura 20:</u> Perfil da insulite em camundongos NOD tratados com o AcMo antiCD4 depletante Y191.....	71
<u>Figura 21:</u> Subpopulações T CD4+ e CD8+ em ilhotas de camundongos NOD tratados com o AcMo antiCD4 depletante Y191.....	73
<u>Figura 22:</u> Tratamento do DMID-CI clínico do camundongo NOD com AcMo antiCD8 depletante Y169.....	75
<u>Figura 23:</u> Efeito do tratamento com o AcMo antiCD8 depletante Y169 sobre o fenótipo das subpopulações T esplênicas CD4+ e CD8+.....	76
<u>Figura 24:</u> Marcação por imunofluorescência dos esplenócitos T de camundongos NOD, tratados com o AcMo antiCD8 depletante Y169.....	77
<u>Figura 25:</u> Perfil da insulite em camundongos NOD tratados com o AcMo antiCD8 depletante Y169.....	79

<u>Figura 26:</u> Subpopulações T CD4+ e CD8+ em ilhotas de camundongos NOD, tratados com o AcMo antiCD8 depletante Y169.....	81
<u>Figura 27:</u> Efeito do tratamento com o AcMo antiCD8 Y105 sobre o fenótipo das subpopulações T esplênicas CD4+ e CD8+.....	82

ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac: anticorpo

AcMo(s): anticorpo(s) monoclonal(monoclonais)

ADCC: "antibody-dependent cell mediated cytotoxicity"

APC: "antigen-presenting cell"

BB: "bio breeding"

BB-DP: "BB-diabetes prone"

BB-DR: "BB-diabetes resistant"

CD: "cluster differentiation"

CI: ciclofosfamida

cf: conforme

CPH: Complexo Principal de Histocompatibilidade

DMG:Diabetes Melito Gestacional

DMID: Diabetes Melito Insulino-dependente

DMID-CI: Diabetes Melito Insulino-dependente induzido pela Ciclofosfamida

DMNID: Diabetes Melito Não Insulino-dependente

E.U.A.: Estados Unidos da América

FITC: "fluorescein isothiocyanate"

FSC: "forward scatter"

G: grau

GAD: "glutamic acid decarboxylase"

GLUT: "glucose transporter"

HE: hematoxilina-eosina

HAMA: "human anti-mouse antibody"

HLA: "histocompatibility leucocyte antigens"

HSP: "heat shock protein"

IAA: "insulin autoantibodies"ICA: "islet-cell antibodies"

Ig: "immunoglobulin"

IL: "interleukin"

IL1R: "interleukin-1 receptor"

IL2R: "interleukin 2 receptor"

i.p.: intraperitoneal

LADA: "Latent Autoimmune Diabetes in Adults"

L.B: linfócitos B

L.T: linfócitos T

min: minutos

NK: "natural killer"

NOD: "non obese diabetic"

PE: "phycoerythrin"

SCID: "severe combined immunodeficiency"

SD: "standard deviation"

sem: semana

SSC: "side scatter"

TBS: "Tris Buffered Saline"

TCR: "T cell receptor"

TCR-V: região variável

TCR-J: região juncional

Th: "T helper"

V: volume

x: média



Resumo

O camundongo NOD é um modelo espontâneo de diabetes auto-imune, cuja expressão clínica de síndrome hiperglicêmica é mais freqüente em fêmeas (em torno de 60%) do que em machos (< 10%), entre a 20ª e 25ª semanas de vida. Uma infiltração linfomononuclear progressiva das ilhotas de Langerhans (insulite), iniciada na 5ª semana de vida, em ambos os sexos, precede o desenvolvimento clínico do diabetes. A doença é mediada por células T CD4+ e CD8+ com auto-reatividade anticélula β .

A Ciclofosfamida (CI), administrada a animais NOD de oito semanas de vida, induz o diabetes clínico em machos e o acelera em fêmeas, por provável depleção de células T supressoras dos mecanismos diabetogênicos. Este modelo (DMID-CI) é um instrumento experimental para aplicação de protocolos terapêuticos, descritos, sobretudo, em fase inicial do processo auto-imune. O objetivo deste estudo foi o de testar a eficiência de uma imuno-intervenção no DMID-CI do camundongo NOD, em fase avançada de insulite, com anticorpos monoclonais (AcMos) depletantes antiCD4 e antiCD8, estratégia pouco documentada na literatura.

Foi caracterizado, inicialmente, o perfil de evolução da insulite, induzida em dois modelos de administração de ciclofosfamida (uma e duas doses de 200 mg/kg/dose, no intervalo de 14 dias) para definir-se a janela terapêutica adequada. A análise histológica da insulite, em NOD machos e fêmeas, semelhante em ambos modelos, demonstrou um momento preciso de progressão rápida de insulite em estádios avançados (invasivo/destrutiva), com paralela diminuição de ilhotas normais ou com periinsulite. Este momento consistiu de um intervalo, situado entre o 7º e o 14º dias após a primeira dose de CI, considerado como o de estabelecimento do processo imunopatológico no pâncreas. A expressão do DMID clínico foi, porém, significativamente aumentada duas semanas após a segunda dose da droga (80% em ambos os sexos). A insulite, induzida por CI, apresentou evolução fenotípica (análise imuno-histoquímica) similar à desenvolvida espontaneamente em camundongos NOD, com predomínio de células T CD4+ em estádios iniciais e aumento da proporção de CD8+ em fase avançada.

A prevenção do DMID-CI clínico foi alcançada, de forma similar, através de imunoterapia isolada com AcMos depletantes antiCD4 (YTS-191) e antiCD8 (YTS-169), iniciada em momento crítico de progressão de insulite invasivo/destrutiva (10º dia após a primeira dose de CI). O sucesso terapêutico foi obtido com protocolo de curta duração (10 dias) e de baixas doses totais de AcMos (0,5 a 1,25 mg/camundongo). O tratamento com antiCD4 impediu a evolução da insulite para os estádios finais, os quais não foram, porém, bloqueados por antiCD8.

A estratégia terapêutica utilizada demonstrou o potencial interesse clínico dos AcMos antiCD4+ e antiCD8+ no bloqueio de subpopulações T executoras da destruição auto-imune das células B.



1. Introdução

1.1. CONCEITOS GERAIS

O diabetes melito é definido como uma síndrome de hiperglicemia crônica, resultante da falta de produção de insulina ou do excesso de fatores que se oponham à sua ação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1980). Diferenças clínicas relevantes permitiram a classificação da síndrome diabetes melito em duas grandes categorias, enunciadas, em 1979, (NATIONAL DIABETES DATA GROUP), como: 1) Diabetes Melito Insulino-dependente (DMID) ou tipo I e 2) Diabetes Melito não Insulino-dependente (DMNID) ou tipo II.

O DMNID tem distribuição universal e sua prevalência é notoriamente superior à do DMID, em qualquer parte do mundo, afetando, em média, 5% da população adulta. É, sobretudo, esta categoria que engloba muitas variantes da doença, originadas principalmente por insulino-resistência e associadas com outras síndromes metabólicas, como obesidade e dislipidemia (DeFRONZO & FERRANNINI, 1991). No Brasil, os dados sobre a prevalência do diabetes melito provêm do estudo de MALERBI et al. (1992), sendo descrita como de 7,6% para uma população urbana entre 30 e 60 anos. O DMID, classicamente identificado como sendo de início agudo, acometendo crianças e adolescentes, tem uma origem auto-imune, que será descrita posteriormente.

Os conceitos contemporâneos sobre a heterogeneidade das duas formas, abrangendo: patogênese, determinantes genéticos e aspectos clínicos, suscitam o debate sobre uma reclassificação do diabetes melito, como proposto por ZIMMET (1995). Observações realizadas em adultos, de diferentes populações, propiciou a ZIMMET et al. (1994) a definição de uma categoria de DMID, denominada Diabetes Auto-imune Latente em Adultos ou LADA ("Latent autoimmune diabetes in adults"). Estes pacientes desenvolvem o DMID, de forma não clássica, usualmente após a idade de 20 anos, e constituem uma significativa, embora ainda não definida, proporção de diabéticos adultos. Também são relevantes outras observações compiladas por ZIMMET (1995), que sugerem que um pequeno subgrupo de mulheres com Diabetes Melito Gestacional (DMG), aproximadamente 2% dos casos, apresentaria uma forma lenta de DMID, similar à LADA.

Finalmente, começa a ser definida uma forma possivelmente rara de DMID, de origem não auto-imune. Duas drogas, com efeito diabetogênico, por toxicidade pancreática, foram descritas no homem: Vacor (KARAM et al., 1980), um rodenticida, e Pentamidina (BOUCHARD et al., 1982), uma droga utilizada na profilaxia do *Pneumocystis carinii* em pacientes com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

O conjunto destes dados corrobora o aspecto sindrômico do diabetes melito, considerado, então, como um grupo de doenças predominantemente poligênicas e multifatoriais. Reivindica, paralelamente, a necessidade de se estabelecer novos critérios para melhor distinção das diferentes formas da doença. Estes critérios estão sendo elaborados a partir dos conhecimentos adquiridos em diabetologia clínica e experimental, e dos avanços metodológicos para a identificação de genes determinantes de doenças. Citam-se:

- 1) O correto fenótipo das diferentes categorias de diabetes melito, realizada através da associação entre: a) dados clínicos/epidemiológicos, b) análises bioquímicas, e c) marcadores metabólicos e imunológicos de disfunção e/ou agressão da célula B insulino-secretora.
- 2) O genótipo destas categorias, seguindo-se os modelos atuais para "screening" de genes candidatos, baseados nos mecanismos patogénéticos das diversas formas de diabetes melito. Estes genes estão sendo derivados de estudos populacionais de larga escala e de famílias afetadas.

A aplicação destes critérios tem utilidade clínica fundamental para a adequação de: 1º) terapêutica, em caso de doença estabelecida; 2º) estratégias preventivas das diversas formas de diabetes melito, importante objeto de estudo de uma área da diabetologia moderna. Este trabalho refere-se particularmente à imuno-intervenção, via células T, do diabetes melito auto-imune, que será detalhado a seguir.

1.2. DMID: HISTÓRIA NATURAL DE UMA SÍNDROME AUTO-IMUNE

A primeira forte evidência para a origem auto-imune do DMID foi introduzida por BOTTAZZO et al., em 1974. Os autores descreveram auto-anticorpos circulantes, denominados anticorpos anticélula da ilhota ou ICA (ICA: "islet-cell antibodies"), detectados por imunofluorescência indireta sobre cortes de pâncreas humanos, em pacientes com DMID. Atualmente, sabe-se que os ICA e outros auto-anticorpos, eventualmente detectados nestes pacientes, são marcadores imunológicos do DMID, sem efeito patogênico direto. O DMID é definido como uma doença auto-imune crônica, causada pela destruição seletiva das células β das ilhotas de Langerhans pancreáticas, num processo mediado por células T (ROSSINI et al., 1993). Seu determinismo é poligênico e multifatorial.

A auto-imunidade, no DMID, é caracterizada pela perda de tolerância dos linfócitos T a constituintes da célula β pancreática, insulino-secretora. Os conhecimentos atuais para esta definição etiopatogênica foram auxiliados pelo concomitante esclarecimento dos mecanismos envolvidos na manutenção da tolerância imunológica ao próprio do organismo (SCHWARTZ, 1993), revisados por VOLPINI & TAMBASCIA (1996a).

Destaca-se a introdução do conceito de auto-reatividade fisiológica (GOODNOW, 1989), evidenciado pela presença de clones auto-reativos em ambos repertórios de células B e T, em indivíduos normais, de importância fundamental para a concepção de doença auto-imune propriamente dita. ROSE & BONA (1993) reformularam, então, os critérios originais, propostos por WITEBSKY, para definição das doenças auto-imunes, demonstradas em presença de auto-reatividade patológica.

No DMID, a longa evolução e determinismo multifatorial, que evocam, por um lado, seu irrefutável caráter sindrômico, dificultam, por outro lado, a evidência do sítio intrinsecamente anômalo: sistema imunológico ou célula β . Contudo, os conceitos de tolerância, acima descritos, e os adquiridos pelo estudo de modelos experimentais de DMID, fortalecem as hipóteses que implicam o sistema imunológico na origem da

promoveriam, num indivíduo, o desequilíbrio entre subpopulações de células T executoras e protetoras da diabetogênese (revisões de: ROSSINI et al., 1993; BACH, 1994a).

Os propostos mecanismos de ruptura da tolerância imunológica no DMID, explorados experimentalmente em murinos, são vários, envolvendo anomalias da tolerância central tímica e, sobretudo, pós-tímica, da tolerância periférica. O DMID clínico desenvolver-se-ia em estádios, por crescente falha no bloqueio (anergia e/ou supressão periféricas) da reatividade anticélula B. Estes distúrbios convergiriam, porém, para a resposta comandada por linfócitos T CD4+ (CD: "cluster differentiation"), contra constituintes da célula B, processados e expostos por células apresentadoras de antígenos, APCs (APC: "antigen-presenting cell").

Sendo o DMID sindrômico, admitem-se, pois, vários processos imunopatogênicos, cuja dissecção é complexa. Interferem nesta complexidade dois grandes fatores. Em primeiro lugar, a hipótese de que a célula B pancreática seria particularmente suscetível a fatores variados de agressão, especialmente os derivados do sistema imunológico, como citocinas e radicais livres (EIZIRIK, SANDLER, PALMER, 1993; POCIOT et al., 1994). Peculiaridades da célula B na expressão de peptídios imunogênicos, sob efeito do ambiente, como: toxinas, dieta (proteínas do leite de vaca, por exemplo) e infecções virais, também poderiam influenciar sua fragilidade à auto-reatividade (BACH, 1994a).

Em segundo lugar, tanto no homem, como em modelos murinos da doença, o auto-antígeno primário do DMID ainda não está caracterizado. Vários auto-antígenos candidatos, constituintes da célula B, foram, porém, descritos, tendo sido definidos, em sua maioria, com o auxílio de auto-anticorpos circulantes. A relevância destes candidatos deve, contudo, ser avaliada junto à base imunopatogênica do DMID, que é dependente de células T, e cujo reconhecimento antigênico difere do das células B (DAVIS & BJORKMAN, 1988; RETH et al., 1991). Estão abaixo citados os principais auto-antígenos candidatos do DMID (ATKINSON & MACLAREN, 1993; RABIN et al., 1994; PAYTON, HAWKES, CHRISTIE, 1995): sialoglicolipídios, alvos dos anticorpos antiilhota: ICA; ICA512/IA-2

(molécula "tyrosine phosphatase like"); GAD-65 (GAD: "glutamic acid decarboxylase") e GAD-67; insulina; receptor da insulina; componentes do grânulo secretor de insulina, 38 kDa e carboxipeptidase H; albumina bovina sérica; transportador de glicose GLUT-2 (GLUT: "glucose transporter"); hsp 65 (hsp: "heat shock protein"); proteínas não identificadas, de 52 kDa e 150 kDa; periferina (58 kDa), presente em insulinoma de rato (linhagem RIN5F).

Assim, parece consensual que múltiplos mecanismos devam coexistir para a expressão do DMID, sobretudo na população humana, englobando os mencionados aspectos do sistema imunológico e da célula β . Estes, por sua vez, seriam controlados pela interação de uma predisposição genética (poligênica), com fatores determinados pelo ambiente. A Figura 1 resume os diversos mecanismos acima citados para o desenvolvimento de auto-imunidade anticélula β no DMID.

O papel do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) na predisposição genética ao DMID, assim como nas doenças auto-imunes em geral, tem importância fundamental e está estritamente relacionado com a patogênese destas enfermidades. Os genes do CPH influem no desenvolvimento do DMID, da mesma maneira que condicionam o repertório T do adulto, em três níveis principais (NEPOM & ERLICH, 1991):

- 1) Seleção positiva de clones auto-reativos no timo: alelos de suscetibilidade.
- 2) Ausência de seleção negativa no timo: ausência de alelos protetores para deletar clones auto-reativos.
- 3) Ausência de anergia periférica de clones auto-reativos: gradiente de afinidade do CPH com o complexo: peptídeo/TCR (TCR: "T cell receptor"); ausência de células T supressoras restritas ao CPH.

Um grande número de evidências, revistas por CASTAÑO & EISENBARTH (1990), descritas originalmente em estudos multicêntricos de familiares em primeiro grau de pacientes com DMID, indicam que a história natural do DMID é preponderantemente lenta, paralela à gradual destruição das células β . Estas observações foram confirmadas, em nível experimental, graças a disponibilidade de dois modelos animais espontâneos da doença, que serão discutidos posteriormente.

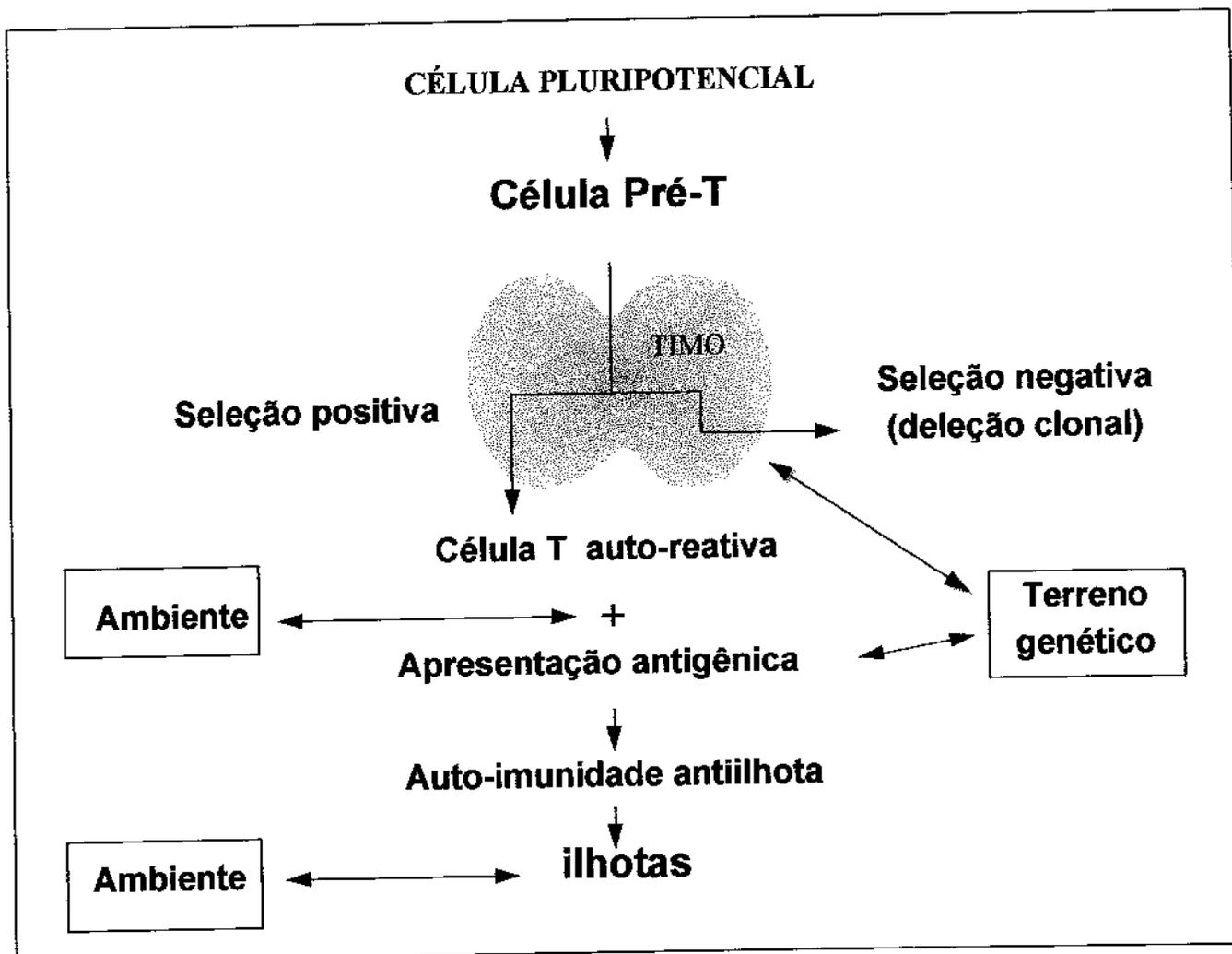


Figura 1: Mecanismos de desenvolvimento de auto-reatividade anticélula B pancreática, no diabetes auto-imune.

Admitem-se, então, no curso do DMID, dois períodos: 1º) Pré-diabetes clínico, uma larga fase, denominada pelo termo pré-diabetes, de anomalias imunometabólicas, que precede o aparecimento clínico da doença e 2º) DMID clínico, caracterizado pelo desenvolvimento de sintomatologia decorrente de síndrome hiperglicêmica, associada com mais de 80% de perda funcional da massa β pancreática.

O período de pré-diabetes clínico é definido pela presença de marcadores tecnicamente padronizados, divididos em três categorias: a) Genéticos: sobretudo alelos do CPH, HLA ("Histocompatibility Leucocyte Antigens"): A1, B8, DR3, DQB1*0201 e DR4 DQB1*0302; b) Imunológicos: auto-anticorpos circulantes: ICA, IAA ("Insulin autoantibodies"), antiGAD e c) Metabólicos: alterações da primeira fase de insulino-secreção. Estes marcadores, estudados principalmente na população caucasóide e detalhados na revisão de VOLPINI & TAMBASCIA (1996b), adquiriram grande importância na prática clínica. Por um lado, são utilizados nos programas de detecção de populações com risco de desenvolver DMID, estendidos, atualmente, não só aos familiares de pacientes com DMID, como também a indivíduos com poliendocrinopatias ou com antecedentes de hiperglicemia, entre outros. Por outro lado, têm caráter diagnóstico em situações clínicas controversas, como nas mencionadas categorias de diabetes melito, LADA e DMG, e em casos de falência secundária a hipoglicemiantes orais.

No Brasil, ainda não estão definidos os marcadores imunogenéticos na população de diabéticos com DMID, de forma representativa da extensão territorial e da grande miscigenação racial no País. Um estudo (EIZIRIK et al., 1987), revelou a maior frequência de alelos HLA-A2, -B15, -DR3 e -DR4 em pacientes com DMID na região Centro-sul, oriundos de caucasóides europeus, índios brasileiros e negróides. A presença de ICA foi descrita em 73,9% (DIB et al., 1983), sendo a de IAA, de 37,5% (OLIVEIRA et al., 1993), em pacientes com DMID recente, valores médios similares aos descritos em populações caucasóides.

A evidência do período de pré-diabetes clínico propiciou a melhor compreensão dos mecanismos imunopatogênicos do DMID, originando a apreciável possibilidade de intervir-se em seu curso natural, prevenindo-o nos indivíduos de risco. Encontra-se, sobretudo no período pré-clínico, a maior eficiência de imunoterapias, com finalidade de preservar células β , viáveis para prevenir a insulino-dependência exógena.

Salienta-se, porém, que o conhecimento da patogênese do DMID e das prováveis estratégias de prevenção da doença continua sendo claramente beneficiado pelo estudo de modelos animais de diabetes auto-imune. Sua contribuição foi particularmente importante para as evidências diretas do envolvimento da imunidade celular T na destruição das células β , principal interesse de nosso estudo. Serão comentados, a seguir, somente os modelos espontâneos de DMID: o camundongo NOD e o rato BB.

1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS ESPONTÂNEOS DE DIABETES AUTO-IMUNE

1.3.1. Camundongo NOD ("non obese diabetic")

O camundongo NOD foi descoberto no Japão, por MAKINO et al. (1980), após o cruzamento de uma sublinhagem CTS (propensa à catarata) com uma linhagem não consanguínea ICR. O primeiro caso de DMID foi observado num camundongo fêmea, após o qual se estabeleceu a linhagem NOD consanguínea por cruzamentos isogênicos. Esta linhagem foi, então, distribuída à comunidade científica mundial, registrando-se, na atualidade, 22 colônias já estabelecidas em diversos países (POZZILLI et al., 1993). No Brasil, a linhagem NOD foi recentemente implantada por PAVIN & ZOLLNER (1994) e encontra-se em fase de caracterização, em função das condições locais.

Usa-se denominar as colônias NOD pelo nome do laboratório de manutenção das mesmas, como: NOD/Wehi ("Walter and Eliza Hall Institute"); NOD/Shi ("Shionogi Research Institute"); NOD/Lt ("Leiter"). Estas colônias diferem quanto à frequência e idade

de aparecimento do DMID, possivelmente como consequência das diferentes condições ambientais de manutenção dos animais, sendo também designadas como de alta ou baixa frequência de diabetes espontâneo (POZZILLI et al., 1993). O DMID clínico desenvolve-se entre o quarto e o sexto mês de vida do animal, apresentando-se como síndrome hiperglicêmica. Todas as colônias apresentam, porém, um dimorfismo sexual quanto ao desenvolvimento do DMID, que é mais freqüente em fêmeas que em machos. A incidência do DMID, observada nas diferentes colônias, para animais de 20 semanas de idade, varia entre 5% e 90% nas fêmeas, e entre 0% e 50% nos machos.

O diabetes clínico é, como no homem, precedido por uma fase de pré-diabetes, caracterizada pela infiltração progressiva das ilhotas pancreáticas por células mononucleares (insulite), que se inicia ao redor do primeiro mês de vida, nos dois sexos (KIKUTANI & MAKINO, 1992). A insulite é constituída, preponderantemente, por células T ativadas, caracterizadas fenotipicamente pela expressão do receptor da interleucina 2 (IL: "interleukin"): IL2R+ (IL2R: "interleukin 2 receptor"). As células T CD4+, como demonstrado em experiências de transferência (THIVOLET et al., 1991), são as primeiras a invadirem as ilhotas, sendo necessárias à migração posterior de células T CD8+. Marcadores imunológicos e metabólicos, desta fase, também foram descritos (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

O modelo experimental do camundongo NOD tem sido amplamente explorado para a identificação dos genes de predisposição ao DMID. Os resultados destes estudos mostram que o papel do CPH, denominado H-2 no camundongo, é dominante no desenvolvimento do DMID. Esta linhagem caracteriza-se por apresentar peculiaridades em moléculas de classe II do CPH, cujas denominações, assim como de suas regiões genômicas codificadoras, são I-A e I-E. O camundongo NOD apresenta um haplótipo do CPH que lhe é particular, **H-2^{g7}**: K^d, I-A^{nod}, I-E⁻, D^b (HATTORI et al., 1986) e, como ocorre em outras linhagens, não expressa moléculas I-E, devido a uma mutação do promotor do gene E α , que codifica a cadeia α da molécula. Um possível efeito protetor de

I-E ainda não está esclarecido, sendo discutida sua atuação na eliminação de clones T auto-reativos no timo (NISHIMOTO et al., 1987; LUND et al., 1990).

Como observado em moléculas HLA DQ, no homem, o camundongo NOD caracteriza-se pela substituição do aminoácido Asp em posição 57 da cadeia β da molécula I-A, segundo descrição de ACHA-ORBEA & MCDEVITT (1987). A molécula I-A β ^{NOD} está associada à suscetibilidade ao desenvolvimento de insulite, como confirmado em camundongos NOD, expressando moléculas I-A transgênicas, com os resíduos Asp⁵⁷ e His⁵⁶ (ACHA-ORBEA & MCDEVITT, 1987; MIYASAKI et al., 1990). Estes animais apresentam uma insulite menor e não manifestam o DMID clínico.

A base da suscetibilidade poligênica ao DMID tem sido confirmada em estudos com o camundongo NOD. Além da associação com o CPH, dez loci de predisposição à doença, localizados fora da região do CPH, foram já descritos (GHOSH et al., 1993). A predisposição à periinsulite, insulite e DMID clínico parece depender da interação de um número crescente de genes, respectivamente, como representado na Figura 2. No cromossomo 1, dois genes são candidatos: bcl-2, cujo produto está associado com a regulação da apoptose, e IL1R ("interleukin-1 receptor"). No cromossomo 3, são candidatos: IL2 ("interleukin-2") e o receptor de alta afinidade para IgG, Fc γ . Outros genes, ainda não identificados, situam-se nos cromossomos: 4, 6, 7, 9, 11 e 14.

O camundongo NOD apresenta outras manifestações auto-imunes, além do DMID: predominantemente sialite (KIKUTANI & MAKINO, 1992), raramente tireoidite (BERNARD, ERTUG, MARGOLESE, 1992), e, tardiamente na vida, anemia hemolítica (BAXTER & MANDEL, 1991).

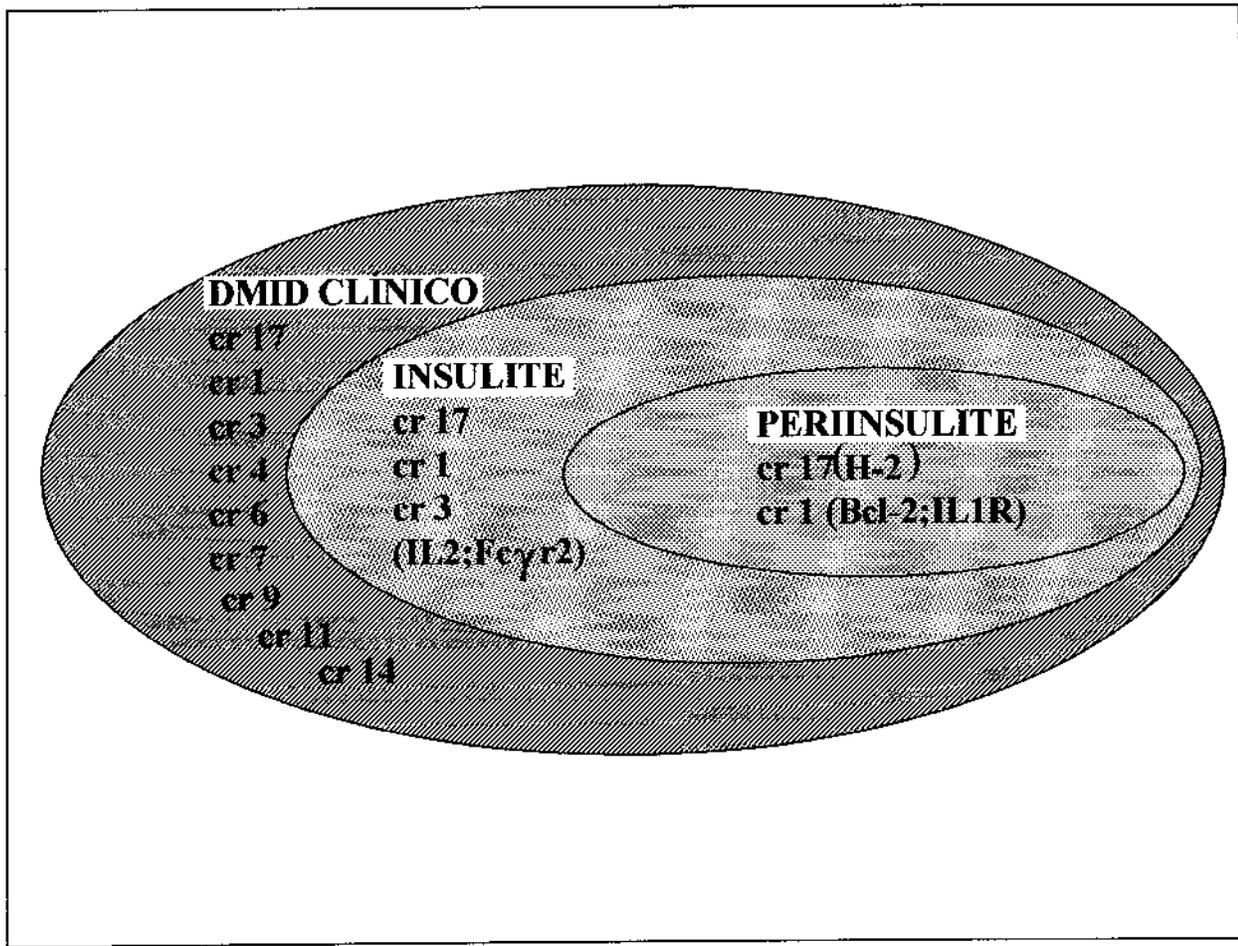


Figura 2: Suscetibilidade poligênica ao diabetes auto-imune, no camundongo NOD.

1.3.1.1. Modelo de Diabetes Acelerado por Ciclofosfamida (DMID-CI)

A Ciclofosfamida (CI) é um potente agente alquilante de DNA, que tem um efeito citotóxico direto preferencial sobre células que se dividem rapidamente (TURK & PARKER, 1982). Em clínica humana, a CI é utilizada como uma droga imunossupressora, particularmente nas doenças auto-imunes mediadas por auto-anticorpos. Antecedendo a caracterização do modelo de DMID-CI, estão os conhecimentos dos efeitos antagônicos da ciclofosfamida sobre o sistema imunológico (supressão x estimulação), em função da dose e do protocolo de administração da droga. A CI aumenta as reações de hipersensibilidade retardada quando administrada na dose de 150mg/kg, em camundongos, oito dias antes da inoculação de antígeno (MITSUOKA, BABA, MORIKAWA, 1976). Estas reações são temporariamente inibidas se a mesma dose de CI for injetada após o antígeno ou, abolidas, se os animais forem timentomizados (MITSUOKA et al., 1979). Estas observações levaram os autores a concluírem que, a CI agiria provavelmente através da eliminação, associada à lenta recuperação, de células reguladoras (função de supressão) da resposta de hipersensibilidade retardada.

Estes estudos foram, então, estendidos às doenças auto-imunes experimentais, induzidas por antígenos. Assim, a CI favorece o desenvolvimento de encefalite alérgica experimental (LANDO, TEITELBAUM, ARNON, 1980) e do DMID por baixas doses de estreptozotocina (KIESEL et al., 1981), em camundongos geneticamente resistentes à indução destas patologias. Explorando estes resultados numa doença auto-imune espontânea experimental, HARADA & MAKINO (1984) descrevem o modelo de DMID acelerado por ciclofosfamida (DMID-CI) no camundongo NOD, utilizado, atualmente, por vários autores para estudar os mecanismos de imunopatogênese e imuno-intervenção da doença. No modelo de DMID-CI original, duas injeções de 200mg/kg de CI, num intervalo de catorze dias, em animais entre oito e dez semanas de vida, induzem o DMID na maioria dos machos e aceleram o aparecimento nas fêmeas, em duas a três semanas.

Um grupo de pesquisadores australianos, dirigido por MANDEL (CHARLTON & MANDEL, 1988; CHARLTON, BACELJ, MANDEL, 1988; CHARLTON et al., 1989), aprofundou o estudo do modelo DMID-CI, descrevendo que o efeito diabetogênico da CI decorre de sua ação sobre o sistema imunológico e não de uma ação citotóxica direta, não específica, sobre as células β pancreáticas. Os autores observaram a sensibilidade exclusiva do camundongo NOD às ações da CI, estudando a linhagem NOD/Wehi, de baixa incidência de DMID espontâneo, em análise conjunta de doze diferentes linhagens de camundongos.

Os mesmos autores sugerem que, a fisiopatologia do DMID-CI do camundongo NOD é similar à da doença espontânea. A CI atua sobre o sistema imunológico, acelerando o processo auto-imune natural da linhagem. Os estudos foram baseados no efeito da depleção, *in vivo*, de subpopulações T sobre a evolução da insulite, e em modelos de isotransplantes de pâncreas ou de transferência do DMID entre NOD/Wehi adultos. Observou-se, então, que a destruição das células β pancreáticas, no modelo DMID-CI, é dependente de células T CD4+ e CD8+, como ocorre no DMID espontâneo da linhagem NOD. Os autores supõem que, a administração de CI induziria a deleção sistêmica de células T, supressoras e executoras, específicas do DMID. As células T executoras, possivelmente CD4+, seriam, contudo, reconstituídas mais rapidamente, promovendo a evolução da insulite pancreática e o aparecimento do DMID clínico. Os mecanismos moleculares da ação diabetogênica da CI não estão, porém, elucidados.

1.3.2. Rato BB ("Bio Breeding")

O modelo de diabetes auto-imune do rato BB foi caracterizado no Canadá, por NAKHOODA et al. (1977). O rato BB, denominado DP (BB-DP: "diabetes prone"), desenvolve um DMID clínico, caracterizado por síndrome hiperglicêmica, entre o segundo e o quarto mês de vida, tanto em machos como em fêmeas. A frequência de aparecimento do DMID varia de 40 a 70% entre as diferentes colônias estabelecidas no mundo, que são

em torno de trinta, reconhecidas pelo nome do respectivo laboratório, como BB/E ("Edinburg"), BB/Phi ("Philadelphie") BB/Wor ("Worcester"), etc.. O rato BB, denominado DR (BB-DR: "diabetes resistant"), deriva do rato BB-DP, mas foi selecionado pelo fenótipo de ausência de DMID, cuja prevalência é, nesta linhagem, entre 1 e 3% (LIKE, GUBERSKI, BUTLER, 1986).

O DMID clínico é precedido por um período de pré-diabetes, caracterizado por insulite progressiva e auto-anticorpos antiilhotas. A insulite é composta principalmente por células T CD4+ e CD8+, incluindo macrófagos e células B (SEEMAYER et al., 1982). Um fato, porém, diferencia, este modelo, do camundongo NOD e do homem. Trata-se do achado de células NK (NK: "natural killer") como componentes da insulite, tendo-lhes sido atribuído um papel importante nos mecanismos de destruição das células β , no rato BB-DP. No camundongo NOD e também no homem, são as células T as implicadas de maneira praticamente exclusiva, direta ou indiretamente, respectivamente, como causadoras da lesão pancreática.

O DMID não constitui, porém, a única manifestação de auto-imunidade do rato BB, que apresenta, em contraste com o camundongo NOD, uma frequência elevada de tireoidite e diversos auto-anticorpos, como: antitireoglobulina, antimucosa gástrica, antimúsculo liso (YALE & MARLISS, 1982).

Do ponto de vista da imunidade celular, observa-se uma linfopenia T intensa, desde o período neonatal (JACKSON et al., 1981). Animais com oito semanas de vida possuem, em baço e gânglios, um déficit de 40 a 50% do número de células T, principalmente CD4+ e, sobretudo, da subpopulação definida, no rato, pelo fenótipo RT6+ (ELDER & MACLAREN, 1983; GREINER et al., 1986). Esta deficiência imunológica se manifesta, no plano funcional, por uma diminuição, *in vitro*, da resposta proliferativa linfocitária a mitógenos e aloantígenos e, *in vivo*, por uma aceitação significativamente mais prolongada de aloenxertos de pele. Uma consequência desta imunossupressão é a grande suscetibilidade do rato BB-DP a infecções bacterianas, virais ou fúngicas, salientando-se o risco particular de infecções por *mycoplasma pneumoniae*.

O modelo do rato BB tem sido relevante para a compreensão da função reguladora, exercida *in vivo*, pelos linfócitos T RT6+. RT6 é marcador fenotípico de células T associadas com a regulação negativa de diversas respostas imunológicas no rato, assim como do DMID desenvolvido pelo rato BB-DP (ROSSINI et al., 1986).

Os antígenos RT6 foram inicialmente definidos no rato, com alo-anti-soros, tendo sido caracterizados, posteriormente, anticorpos monoclonais (AcMos) específicos (MEGY et al., 1983). THIELE et al. (1986) e KOCH et al. (1990) identificaram, por análise bioquímica, duas proteínas de membrana, denominadas RT6.1 e RT6.2, que são produtos de dois alelos diferentes: RT6^a e RT6^b, respectivamente. Da mesma maneira, certos antígenos da superfície linfocitária, como Thy-1 (ROBINSON, 1991), RT6.1 e RT6.2 são proteínas ancoradas à superfície celular por intermédio de uma ligação covalente com um grupamento glicosil-fosfatidil-inositol, sendo denominadas, então, moléculas "GPI-linked" (GPI: "glycosil phosphatidylinositol"), segundo a terminologia anglo-saxônica.

O antígeno RT6 expressa-se unicamente na membrana dos linfócitos T, não tendo sido evidenciado sobre outras células, hematopoiéticas ou epiteliais (MOJCIK et al., 1988). Estudos sobre a ontogênese de sua expressão, em ratos, igualmente demonstraram que RT6 é um marcador exclusivo de células T periféricas maduras, representando 60 a 80% dos linfócitos T CD8+ e 50% dos linfócitos T CD4+ (THIELE, KOCH, KASHAM, 1987; MOJCIK et al., 1988). Os timócitos não exprimem RT6 em sua superfície, nem possuem RNA específico.

A combinação dos marcadores RT6 e Thy1 permite, então, a distinção fenotípica entre células T periféricas maduras (RT6+Thy1-) e células T recentemente exportadas do timo (RT6-Thy1+). LUBAROFF, RASMUSSEN, HUNT (1989) sugerem que uma variação na expressão de RT6 estaria associada a um estado de ativação da célula T. Assim, a estimulação, *in vitro*, de linfócitos T de rato com mitógenos ou aloantígenos foi associada com uma perda de expressão de RT6. Os autores demonstraram que este

fenômeno é reversível, sendo a re-expressão do RT6 acompanhada do retorno ao estado de repouso celular.

Em 1990, KOCH, HAAG, THIELE identificaram o DNAC que codifica o antígeno equivalente ao RT6 do rato, no camundongo, denominado Rt-6. Os autores observaram uma homologia de 80% em seqüência nucleotídica entre as duas espécies. O estudo de polimorfismos de fragmentos de restrição - RFLP (RFLP: "restriction fragment length polymorphism"), efetuado em DNA genômico, revela que, em contraste com o rato, existe um importante polimorfismo do gene Rt-6 no camundongo, para o qual cinco alelos já foram descritos (PROCHAZKA et al., 1991).

A linfopenia do rato BB-DP é caracterizada por uma perda de células T RT6+, causada por um defeito pós-tímico maturacional da linhagem T e não por defeito de expressão do gene RT6 (CRISÁ et al., 1993).

1.4. AS CÉLULAS T NO DIABETES AUTO-IMUNE

1.4.1. Diabetes auto-imune humano

Apesar da origem auto-imune do DMID ser dependente de células T, tal evidência no homem é, até agora, indireta. Os dados referentes a reatividade espontânea, *in vitro*, de células mononucleares de sangue periférico, em pacientes com DMID e pré-diabéticos, são raros e de difícil comparação. Os mesmos diferem, tanto na preparação antigênica utilizada, quanto na metodologia adotada para definir respostas proliferativas como positivas. Assim, foram observadas reatividades de células T a quatro antígenos solúveis, em pré-diabéticos e em pacientes com DMID recente: 1) insulina humana, 2) GAD-65 e GAD-67, 3) ICA512 e 4) glucagon (KELLER, 1990; HARRISON et al., 1992; ATKINSON et al., 1992; HONEYMAN, CRAM, HARRISON, 1993; DURINOVIC-BELLÒ, HUMMEL, ZIEGLER, 1996). Outras observações demonstraram reatividade celular T, de pacientes pré-diabéticos e diabéticos recentes, a antígenos tissulares: ilhotas

humanas e pré-ilhotas fetais porcinas (HARRISON et al., 1991, 1992), preparações membranárias de células RIN (linhagem celular 5AHT2) e de pâncreas humano (DURINOVIC-BELLÒ, HUMMEL, ZIEGLER, 1996). Também foi relatada a reatividade de linhagens de células T, de sangue periférico, à uma proteína de 38 kDa proveniente do grânulo secretório de insulina, em pacientes com DMID recente (ROEP et al., 1991).

Vários fatores devem ser considerados para explicar a ausência de marcadores T bem definidos no DMID. Em primeiro lugar, estão as dificuldades inerentes ao estudo da imunidade celular T na população humana, que envolve a participação de um sistema genético polimórfico regulando a resposta imunológica. A busca de peptídeos auto-reativos associa-se, então, às complexas interações entre o repertório de TCR e o polimorfismo do CPH. A esclerose múltipla representa a única doença auto-imune humana com marcadores celulares T esclarecidos. KOTZIN et al. (1991) descreveu uma maior frequência, assim como um receptor VB restrito de células T, reativas à proteína básica da mielina, em enfermos, comparado à uma população controle.

Em segundo lugar, está a ausência de caracterização do auto-antígeno primário da célula β pancreática no DMID humano. Finalmente, a composição heterogênea do sangue periférico, utilizada nos ensaios de proliferação, não necessariamente reflete eventos patológicos ocorrendo no órgão alvo da agressão imunológica, como o pâncreas, no caso do DMID. Cita-se a doença de Graves, na qual foi descrita uma predominância de células T auto-reativas em linfócitos tireoidianos, não detectadas em sangue periférico (DAYAN et al., 1991). A inacessibilidade aos linfócitos infiltrantes do pâncreas, limita, pois, os estudos no homem.

Assim sendo, a grande base imunopatogênica das células T no DMID decorre da extensa documentação realizada nos modelos espontâneos da doença. Dados experimentais do camundongo NOD e do rato BB-DP comprovam que, o desenvolvimento do DMID decorre da interação entre células T reguladoras, que suprimem a doença, e células T executoras, denominadas diabetogênicas.

1.4.2. Camundongo NOD

1.4.2.1. Células T diabetogênicas

A existência de células T executoras, causadoras da auto-imunidade anticélula β pancreática, no DMID desenvolvido pelo camundongo NOD, foi revelada por uma série de observações, descritas a seguir:

- 1) Preponderância de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ na constituição da insulite (O'REILLY et al., 1991).
- 2) Prevenção do DMID através de timectomia neonatal (OGAWA et al., 1985).
- 3) Ausência de DMID em camundongos NOD/nude (atímicos) (HIDEKI et al., 1992).
- 4) Transferência do DMID, através de células T, de animais NOD diabéticos a receptores NOD não diabéticos. Uma série de modelos de transferência de DMID foi desenvolvida. Sua importância não reside apenas na determinação das células T como originárias da auto-imunidade, mas também na contribuição das diferentes subpopulações linfocitárias na patogênese da doença.

A - Transferência ao adulto: WICKER, MILLER, MULLEN (1986) descreveram originalmente a transferência do DMID, por meio de esplenócitos de NOD diabéticos a receptores NOD adultos (seis semanas de vida). Esta transferência necessita uma prévia irradiação subletal dos receptores e requer ambas subpopulações T $CD4^+$ e $CD8^+$ (MILLER et al., 1988).

B - Transferência ao neonato: BENDELAC et al. (1987) caracterizou um modelo de transferência do DMID em receptores NOD recém-nascidos, que não necessitam irradiação. Os autores demonstraram, neste modelo, o requerimento exclusivo e obrigatório de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e a não relevância de células B nos mecanismos executores do DMID.

C - Transferência a NOD geneticamente imunodeficientes: Camundongos NOD/nude (MATSUMOTO et al., 1993) e NOD/scid ("severe combined immunodeficiency") (CHRISTIANSON, SHULTZ, LEITER, 1993) foram obtidos por modificação do "background" genético NOD por retrocruzamentos repetidos. A utilização destes animais, como receptores, permitiu descartar um possível recrutamento de células T nos animais transferidos e melhor precisar o papel das subpopulações T na indução do DMID. Foi demonstrado, então, que são as células T CD4+ as primariamente responsáveis pelo início da insulite, o que não ocorre em transferência isolada de células T CD8+. Ambas subpopulações T, CD4+ e CD8+, são, porém, necessárias à destruição final das células β pancreáticas e ao desenvolvimento do DMID clínico, nestes modelos de transferência.

D - Transferência com clones T reativos contra ilhota: Clones T CD4+ específicos contra ilhota, provenientes de NOD recentemente diabéticos, foram gerados por algumas equipes e induziram, após transferência isolada, hiperglicemia, em NOD pré-diabéticos (HASKINS & McDUFFIE, 1990) ou insulite, em NOD geneticamente resistentes ao DMID (REICH et al., 1989).

A produção de clones T intra-insulares permitiu o estudo do TCR dos mesmos, a fim de detectar-se uma possível restrição das regiões V α (V: "variable"), V β , ou J (J: "junctional"). Não foi possível, até o momento, observar um TCR particular entre os linfócitos T infiltrantes de pâncreas de camundongos NOD, que se apresenta, porém, diversificado (NAKANO et al., 1991).

5) Prevenção do DMID com tratamentos imunossupressores, que atuam preferencialmente no nível da célula T (BACH, 1994a).

1.4.2.2. Células reguladoras

Vários são os dados experimentais que contribuíram para indicar que, existem células T com função de regulação negativa da auto-imunidade antiilhota, no camundongo NOD:

- 1) Aceleração do DMID através de timectomia, realizada com três semanas de vida (DARDENNE et al., 1989). Esta observação sugere que células T supressoras, timodependentes, regulam o desenvolvimento do DMID. Os autores propõem que sua eliminação, por timectomia, acelera o aparecimento da doença, porque:
 - a) As células T executoras, com efeito diabetogênico direto diferenciar-se-iam precocemente no timo, antes da terceira semana de vida do animal.
 - b) As células T supressoras diferenciar-se-iam mais tardiamente, ou teriam vida média curta, necessitando renovação a curto prazo.
- 2) Aceleração do DMID pela administração de ciclofosfamida (cf. 1.3.1.1). Apesar de não completamente elucidado, o mecanismo de ação da droga está relacionado com a eliminação de células T supressoras e associado com a presença da insulite.
- 3) O DMID é transferível entre camundongos NOD somente quando o receptor está imunodeficiente, ou seja, neonatos ou adultos irradiados subletalmente (cf 1.4.2.1).
- 4) Inibição da transferência do DMID, no adulto, pela reconstituição dos receptores irradiados com esplenócitos T CD4+, provenientes de NOD jovens, não diabéticos, descrita por BOITARD et al. (1989). Estas células T, com função supressora, não seriam mais detectadas nas fêmeas timectomizadas na terceira semana de vida.
- 5) Isolamento de um clone T CD8+ intra-insular de NOD, capaz de prevenir, *in vivo*, tanto o DMID induzido pela CI, como a transferência da doença ao adulto (PANKEWYCZ, STROM, RUBIN-KELLEY, 1991). Foi descrito que este clone liberaria um fator

supressor solúvel, com propriedade de inibir, *in vitro*, a proliferação de linhagens T dependentes de IL2 e IL4 (DIAZ-GALLO, 1992).

6) Prevenção do DMID com a administração de adjuvante de Freund completo (QIN et al., 1993) e superantígenos de *Stafilococos* (KAWAMURA et al., 1993). Em ambos casos, a proteção à doença é transferível a animais NOD, com células T CD4+ de animais tratados. Discute-se que, os mecanismos deste tipo de proteção envolveriam uma ação seletiva sobre certas subpopulações linfocitárias T CD4+, desviando então a resposta imunitária de Th1 (Th: "T helper") à Th2. Células Th2, produtoras de IL4 e IL10, exacerbariam a resposta humoral, em detrimento da resposta celular.

1.4.3. Rato BB

1.4.3.1. Células diabetogênicas

Como para o modelo do camundongo NOD, vários são os argumentos experimentais sobre o papel de células T executoras da auto-imunidade anticélula β , no DMID desenvolvido pelo rato BB:

1) Presença de células T CD4+ e CD8+ na composição do infiltrado insular (SEEMAYER et al., 1982).

2) Experiências de transferência:

A - Transferência do DMID, através de esplenócitos de ratos BB-DP diabéticos, pré-ativados, *in vitro*, com Concanavalina A, a ratos jovens BB-DP não diabéticos, descrita inicialmente por KOEVARY et al. (1983).

B - Transferência do DMID, através de esplenócitos de ratos BB-DP diabéticos, à ratos histocompatíveis, previamente imunossuprimidos (KOEVARY et al., 1985).

C - Transferência do DMID, através de esplenócitos de ratos BB-DR, induzidos diabéticos por tratamento com anticorpos monoclonais depletantes anti-RT6, à ratos BB-DP jovens ou receptores histocompatíveis atípicos (GREINER et al., 1987).

Confirmou-se que, a transferência do diabetes do rato BB é dependente do efeito diabetogênico presente na subpopulação T CD4+ (MÉTRO-DAYER et al., 1990).

3) Prevenção do DMID com tratamentos imunossupressores, que afetam células T (BACH, 1994a).

1.4.3.2. Células reguladoras

O modelo do rato BB contribuiu, efetivamente, para o estudo de células T com potencial de suprimir ou de limitar o desenvolvimento da auto-imunidade anticélula β no DMID. O papel regulador das células T, apresentando o marcador RT6, foi demonstrado através das seguintes experiências:

- 1) Células T expressando o fenótipo RT6⁺ estão ausentes no rato BB-DP (genótipo denominado RT6^{nul}). Encontram-se, porém, presentes em quantidade normal, compatível com outras linhagens de ratos, no rato BB-DR (genótipo RT6^a), que não desenvolve o DMID (GREINER et al., 1986).
- 2) A depleção acentuada de células T RT6⁺ no rato BB-DR, obtida após a injeção, *in vivo*, de anticorpos monoclonais específicos, induz o DMID entre três a quatro semanas, em 50% dos animais (GREINER et al., 1987). Além disso, os animais assim diabéticos, transferem a doença, através de esplenócitos, como descrito no item 1.4.3.1.

- 3) Manipulações como: timectomia neonatal, irradiação corporal, tratamento com Ciclofosfamida, induzem o DMID no rato BB-DR, acarretando um desaparecimento seletivo, a longo prazo, da subpopulação T RT6+ (KOEVARY et al., 1985; LIKE et al., 1982; HANDLER et al., 1989).
- 4) A transferência, ao rato BB-DP, de células T RT6+ histocompatíveis, previne o DMID (ROSSINI et al., 1986). Esta prevenção está associada com a persistência, a longo prazo, no animal receptor, das células RT6+ transferidas.

Recentemente, FOWELL & MASON (1993), utilizando um modelo particular de diabetes induzido no rato, estudaram o perfil de citocinas produzidas pelas células RT6+. Neste modelo, um tratamento associando timectomia no adulto com irradiações corporais, em intervalos definidos, desencadeia em ratos portadores do haplótipo CPH: RT1^μ, um DMID precedido de insulite. Como no modelo espontâneo do rato BB, os autores identificaram células T αβ+CD4+RT6+Thy1- com função de regulação negativa sobre o desenvolvimento da doença, estando depletadas nos animais tratados. Esta subpopulação T foi associada com a produção de um perfil de citocinas correspondente ao das células de tipo Th2, secretoras de IL4 e IL10.

1.5. IMUNO-INTERVENÇÃO DO DIABETES AUTO-IMUNE

Os conhecimentos sobre a patogênese do diabetes auto-imune e a condução de programas, visando sua detecção precoce, levaram à elaboração de estratégias de intervenção em seu curso natural. Os ensaios terapêuticos propostos podem ser considerados, porém, inespecíficos, visto que o auto-antígeno primário da doença é ainda desconhecido. Contudo, a introdução de tratamentos capazes de induzir tolerância, como é o caso dos anticorpos monoclonais (AcMos) anticélulas T, adquire relevância na atualidade (COBBOLD, QIN, WALDMANN, 1990). Serão destacados os principais mecanismos de ação dos AcMos, básicos à compreensão de sua aplicabilidade no modelo de diabetes auto-imune, focalizado neste trabalho.

1.5.1. Anticorpos monoclonais e imuno-intervenção

O desenvolvimento de AcMos, que reconhecem estruturas funcionalmente relevantes das células T, constitui um avanço tecnológico apreciável, tanto para diagnóstico, quanto para terapêutica em Imunologia Clínica (CHATENOUD, 1989). Historicamente, e por razões técnicas, os AcMos são, sobretudo, de origem murina (KÖHLER & MILSTEIN, 1975; GALFRE, MILSTEIN, WRIGHT, 1979). As limitações de seu uso em clínica humana vêm sendo, porém, contornadas pelo aperfeiçoamento de AcMos humanizados (RIECHMANN et al., 1988).

Os mecanismos de ação dos AcMos anticélulas T, representados na Figura 3, dependem dos seguintes fatores: a) do isotipo da imunoglobulina em questão e b) da interação do AcMo com mecanismos executores, *in vivo*, como a opsonização por macrófagos, via receptor Fc (QIN et al., 1987).

A fixação do AcMo sobre seu alvo no sistema imunitário pode, então, acarretar três conseqüências principais:

1 - Depleção celular: através da interação do AcMo com: macrófagos (opsonização), células NK (ADCC: "antibody-dependent cell mediated cytotoxicity") e estimulação de proteínas do sistema de complemento.

2 - Modulação antigênica: através da internalização celular dos complexos antígeno/anticorpo ("capping").

3 - Recobrimento do antígeno alvo: através da permanência do AcMo fixado ao alvo, tornando-o inacessível a seus ligandos naturais.

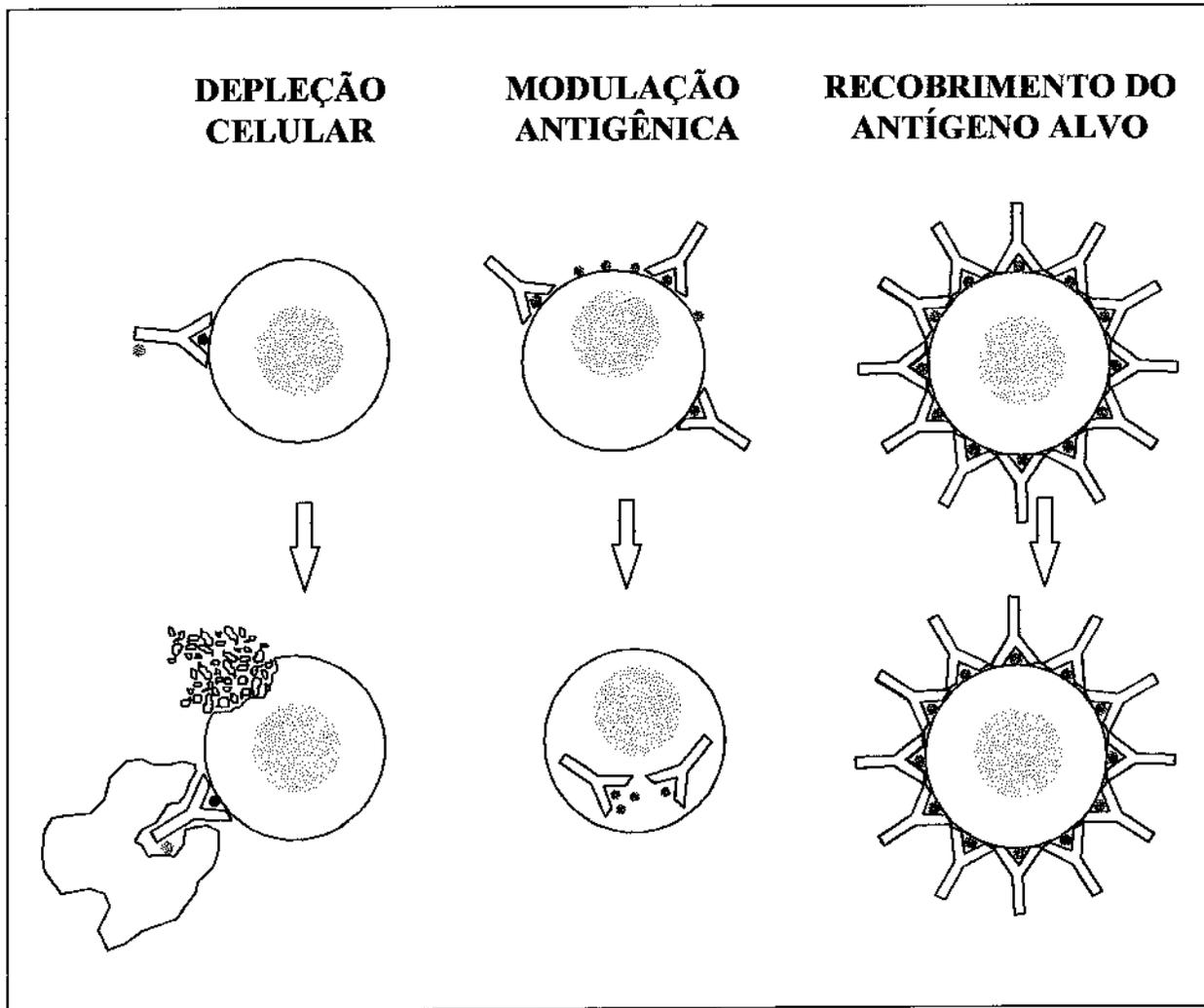


Figura 3: Mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais anticélulas T.

Tanto modulação como recobrimento associam-se a um bloqueio funcional celular, dependendo da relevância da estrutura reconhecida pelo AcMo. Tal estrutura, se participante nos circuitos de transdução de sinais intracelulares de ativação, teria, então, sua ação impedida ou modificada.

A produção de AcMos, dirigidos contra diversos antígenos de células T, permitiu sua exploração clínica, principalmente no domínio da imunossupressão (BACH, FRACCHIA, CHATENOUD, 1993). No homem, o AcMo antiCD3 é o mais extensivamente utilizado, sobretudo, na prevenção de rejeição a alotransplantes. Outras especificidades de AcMos estão sendo também estudadas, incluindo: antiCD4, antiCD25 (CD25: receptor de IL2), antiLFA-1 (LFA: "leucocyte functional antigen").

1.5.2. Imuno-intervenção do diabetes auto-imune humano

As estratégias imunoterapêuticas do diabetes auto-imune humano têm sido direcionadas à duas categorias de indivíduos (BACH, 1994a): 1) diabéticos com DMID recentemente diagnosticado, objetivando a preservação da função das células β residuais, e 2) pré-diabéticos, particularmente os detectados em estudos de familiares de primeiro grau de diabéticos tipo I. O diagnóstico de pré-diabetes está baseado nos marcadores imunogenéticos e metabólicos da doença, visando a prevenção da mesma.

A partir de 1980, terapias de imuno-intervenção têm sido aplicadas a diabéticos tipo I, recentemente diagnosticados, em ensaios controlados. Os agentes utilizados nestas terapias podem ser divididos, segundo seu mecanismo de ação, em duas grandes categorias: imunossupressores e imunomoduladores (revisão de SKYLER & MARKS, 1993).

1.5.2.1. Imunossupressores

Os primeiros estudos basearam-se na utilização de imunossupressores, como glicocorticóides (ELLIOT et al., 1981), em associação com soro antilinfocitário (EISENBARTH et al., 1985) ou com azatioprina (SILVERSTEIN et al., 1988). Os resultados destes tratamentos, de modo geral, não foram satisfatórios.

Dados significativos foram obtidos, porém, com a utilização de Ciclosporina A. Trata-se de um potente imunossupressor, que age seletivamente sobre a ativação das células T, inibindo a secreção de IL2 (SCHREIBER & CRABTREE, 1992). Dois grandes estudos, realizados em pacientes adultos com DMID, e conduzidos na França, Canadá e Escandinávia, apresentaram resultados de eficácia similares (FEUTREN et al., 1986; THE CANADIAN-EUROPEAN DIABETES STUDY GROUP, 1988). Contudo, as remissões (totais: 24%; parciais: 70%) obtidas com Ciclosporina, de forma contínua, mostraram ser transitórias. Além disso, os riscos de nefrotoxicidade e hipertensão, dose dependentes, implicaram num seguimento contínuo dos indivíduos tratados.

Os ensaios com Ciclosporina foram, porém, de importância fundamental, pois permitiram duas grandes conclusões: 1) é possível frear a destruição imune das células β pancreáticas no DMID; 2) é necessário intervir antes que a reserva de células β seja fortemente reduzida.

Outros tratamentos estão sendo conduzidos, atualmente, em nível multicêntrico (Europa, Canadá, E.U.A). Estudos pilotos randômicos, em pacientes com DMID recente, sugeriram um efeito benéfico da Nicotinamida, quando administrada em doses altas e de forma contínua (VAGUE et al., 1988; MENDOLA, CASAMITGANA, GOMIS, 1989). A Nicotinamida, uma vitamina derivada do ácido nicotínico, atua, restaurando o conteúdo de NAD (nicotinamida-dinucleótido) da célula β lesada, preservando sua função. Por outro lado, favoreceria a eliminação de radicais livres, danosos à célula β , liberados por macrófagos do infiltrado insular.

1.5.2.2. Imunomoduladores

Novas terapias, visando atingir mais seletivamente as células T, por seu papel na destruição das células β , no diabetes auto-imune, estão sendo avaliadas. Está em curso um estudo randômico, na Europa e nos Estados Unidos, com IL2 conjugada com toxina diftérica (DAB₄₈₆-IL2), em pacientes com DMID recente. Esta estratégia está baseada na presença de células T CD4⁺ IL2R⁺ no infiltrado insular, alvos da ação citotóxica do conjugado com toxina (BOTTAZZO et al., 1985). Os resultados preliminares de BOITARD et al. (1992), em pacientes com DMID recente, tratados com DAB₄₈₆-IL2, demonstraram sucesso na preservação da insulino-secreção residual.

KELLER, JACKSON, EISENBARTH (1992) apresentaram resultados preliminares de insulino-terapia intensiva em pré-diabéticos (familiares de primeiro grau de diabéticos tipo I). Os autores demonstraram melhor preservação de função da célula β , com prevenção do diabetes clínico nos pacientes tratados. O interesse, neste tipo de tratamento, seria o de otimizar efeitos imunomoduladores da insulina, que ocorreriam em dois níveis. Por um lado, estaria sua ação no sistema imunológico, modulando a ativação das células T (HELDERMAN, PIETRI, RASKIN, 1983). Por outro lado, haveria um possível efeito na célula β . Existe a hipótese de que a insulino-terapia intensiva, antes do desenvolvimento do DMID clínico, diminuiria a expressão de auto-antígenos, alvos do ataque imunológico, através do repouso funcional da célula β (AAEN et al., 1990).

1.5.3. Imuno-intervenção em modelos experimentais espontâneos de diabetes auto-imune

A prevenção total e definitiva do diabetes auto-imune, através de terapias variadas, foi obtida, com sucesso, nos modelos experimentais espontâneos: o rato BB e o camundongo NOD (revisões de: SKYLER & MARKS, 1993; BACH, 1994a; BOWMAN,

LEITER, ATKINSON, 1994). Estas terapias incluem: imunossupressores, imunomoduladores, agentes antiinflamatórios, manipulações dos sistemas imunológico e endócrino, e alterações dietéticas. Além disto, todas as estratégias terapêuticas ensaiadas no homem, tiveram seu êxito previamente comprovado nestes modelos animais.

Ressalta-se, porém, que a maioria dos protocolos terapêuticos aplicados aos animais, iniciaram-se no período de pré-diabetes, antes mesmo da insulite, com duração e doses de difícil transposição ao homem. Possivelmente a precocidade das intervenções induza proteção inespecífica ao diabetes, o que explicaria a eficiência deste amplo espectro de tratamentos (BOWMAN, LEITER, ATKINSON, 1994).

Raros estudos, realizados no camundongo NOD, visaram o tratamento do DMID, em fase avançada de insulite ou de diabetes clínico estabelecido. Todos utilizaram agentes dirigidos às células T: AcMo antiCD4 (SHIZURU et al., 1988), AcMo antiTCR (SEMPÉ et al., 1991), soro antilinfocitário (MAKI et al., 1992), AcMo antiCD3 (CHATENOUD et al., 1994). Estas pesquisas, revisadas no decorrer deste trabalho, focalizam a questão, de interesse fundamental neste estudo:

É possível intervir no curso do diabetes auto-imune, quando já está avançado o processo imunopatológico no pâncreas?



2. Objetivos

- I. Caracterização morfológica da insulite em Modelos de Diabetes Auto-imune induzidos pela Ciclofosfamida (DMID-CI) em linhagem de camundongo NOD de alta frequência de DMID espontâneo.

- II. Definir, nos modelos DMID-CI, um intervalo de tempo (janela terapêutica) caracterizado por estabelecimento majoritário de insulite invasivo-destrutiva, para aplicação de imunoterapia.

- III. Testar a eficiência de um protocolo de imuno-intervenção, utilizando anticorpos monoclonais antiCD4 e antiCD8, no DMID-CI do camundongo NOD, com a finalidade de bloquear a evolução da insulite e as manifestações clínicas de hiperglicemia.



3. Material e Métodos

3.1. ANIMAIS

Os camundongos NOD utilizados neste estudo, provenientes da colônia do laboratório INSERM U-25, Hospital Necker, Paris, França, foram criados em condições isentas de organismos patogênicos específicos (I.O.P.S.). Naquela colônia, a incidência do diabetes espontâneo é de 55% nos camundongos fêmeas e inferior a 5% nos machos, na 25ª semana de vida. Em todas as experiências, a glicosúria dos camundongos foi monitorizada três vezes por semana, através de teste colorimétrico (Glukotest; Boehringer-Mannheim, Mannheim, RFA). Os animais glicosúricos e todos os que chegaram ao final de cada procedimento experimental tiveram avaliação colorimétrica de glicemia (Haemoglucotest e Reflolux F: Boehringer-Mannheim). O diabetes foi diagnosticado pela persistência de um valor de glicemia ≥ 300 mg/dl, em duas análises consecutivas.

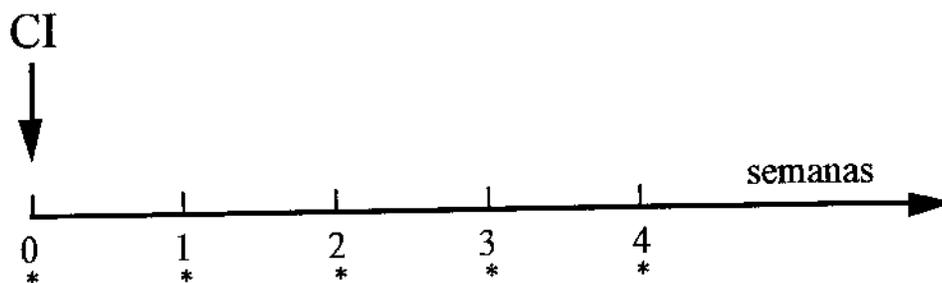
Os camundongos nu/nu Swiss (Iffa-Credo, l'Arbresles, França) foram utilizados para a produção de ascites dos seguintes hibridomas: YTS-191.1.2, YTS-177.9.6, YTS-169.4.2 e YTS-105.18.10.

3.2. DIABETES ACELERADO PELA CICLOFOSFAMIDA (DMID-CI)

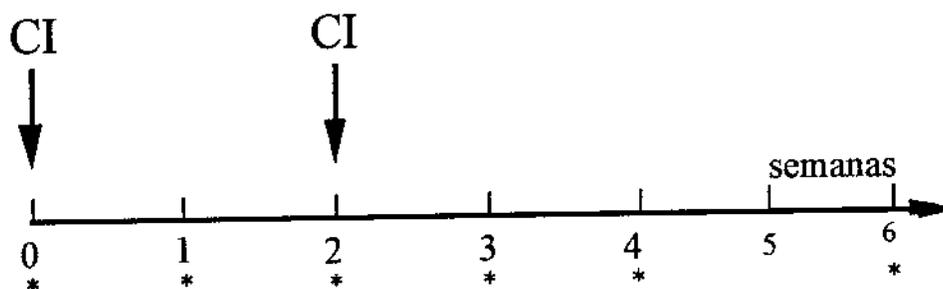
A Ciclofosfamida (CI) (Endoxan-Asta: Sarget, Mérignac, França) foi injetada pela via intraperitoneal (i.p.), na dose de 200mg/kg/injeção, em camundongos NOD machos e fêmeas não diabéticos, de oito semanas de idade. Dois protocolos de administração de CI, representados nos esquemas abaixo, foram utilizados: a) uma única injeção (n=18 animais/experiência) e b) duas injeções, num intervalo de catorze dias, como descrito previamente (HARADA & MAKINO, 1984) (n=18 animais/experiência). O acompanhamento dos animais foi realizado da seguinte maneira: três animais de cada protocolo foram sacrificados antes da injeção de CI (dia 0) e nas semanas 1, 2, 3, e 4, após a primeira injeção da droga. O sacrifício foi feito por decapitação, após prévia anestesia com éter. Foram analisados nestes animais: o fenótipo das subpopulações linfocitárias de baço, e a insulite, através de histologia e imuno-histoquímica dos pâncreas.

PROTOCOLOS DE INJEÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA

a) Modelo I: 1 injeção de CI



b) Modelo II: 2 injeções de CI



* : três animais foram sacrificados para estudos de: subpopulações linfocitárias (baço) e insulite (histologia/imuno-histoquímica de pâncreas).

3.3. ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS *IN VIVO*

Os hibridomas produtores dos anticorpos monoclonais (AcMos) utilizados para o tratamento dos camundongos NOD foram fornecidos por H. WALDMANN (Divisão de Imunologia, Hospital Addenbrookes, Cambridge, RU). Os anticorpos foram produzidos no laboratório INSERM U-25, sob a forma de ascites, obtidas em camundongos nu/nu (pré-tratados com uma injeção i.p. de 0,5 ml de pristane), após uma injeção i.p. de cada hibridoma (2 a 5×10^6 células/injeção). As imunoglobulinas foram purificadas pelo método

de precipitação com sulfato de amônio a 45% de saturação V/V (V: volume), a 4°C, seguida de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE ("diethylaminoethyl"). Após 24 horas de diálise em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4, a 4°C, os anticorpos foram separados em alíquotas e conservados a -20°C.

A dose ideal de cada AcMo a ser injetada nos animais NOD, foi definida em função do efeito biológico obtido, *in vivo*, 36 horas após a administração de doses crescentes do AcMo. A dose escolhida para cada AcMo foi a mínima, que permitiu a obtenção do efeito biológico desejado, avaliado em baço, comparado ao animal controle. A Figura 4 ilustra este teste biológico, demonstrando os resultados observados com o AcMo Y191, cujo efeito biológico desejado é a depleção de células CD4+. Y191 foi injetado i.p., simultaneamente, em diferentes animais NOD, nas doses: 125 µg, 250 µg e 500 µg. A análise de esplenócitos, por imunofluorescência indireta, revelou, então, que a dose mínima de Y191 para alcançar depleção total de esplenócitos T CD4+, foi a de 250 µg.

Os AcMos utilizados nos protocolos terapêuticos, e citados abaixo, foram desenvolvidos por COBBOLD et al. (1984) e induzem, como efeito, depleção da subpopulação celular alvo, em tecidos linfóides periféricos.

Hibridoma	Especificidade (camundongo)	Ação Biológica	Dose/Injeção	Dose Total
AntiCD4				
YTS-191.1.2 (IgG2b de rato)	CD4: epítopo a	depleção	250 µg	1,25 mg
AntiCD8				
YTS-169.4.2 (IgG2b de rato)	CD8: epítopo Lyt2 a	depleção	100 µg	0,50 mg

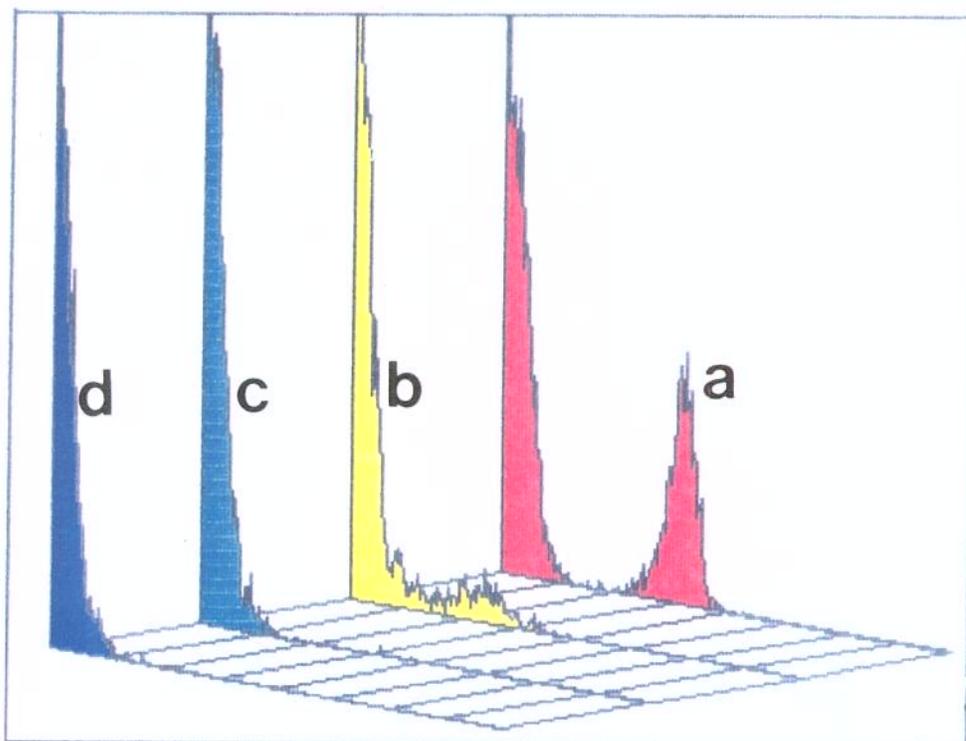


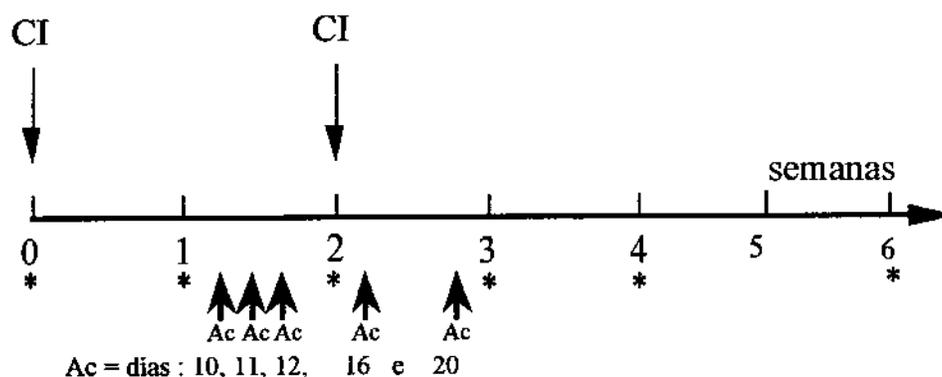
Figura 4: **Teste biológico para pesquisa da dose ideal, *in vivo*, do AcMo antiCD4 depletante Y191.** Y191 foi administrado i.p. a camundongos NOD, nas doses: 125 µg, 250 µg e 500 µg/animal. As imagens representam histogramas de citometria de fluxo da marcação simples, por imunofluorescência, de esplenócitos T CD4+ (GK1.5-FITC), 36 horas após tratamento com Y191. A porcentagem de células T CD4+ marcadas/total de linfócitos são: no animal controle (a): 28%; nos animais tratados com Y191: 8,5%, 0% e 0% para as doses de 125 µg (b), 250 µg (c) e 500 µg (d), respectivamente.

Foi utilizado como AcMo controle YTS-105.18.10, IgG2a de rato antiCD8 (epítopo Lyt2 c), na dose de 100 µg/injeção, cujo efeito biológico descrito (QIN et al, 1989) é o de não depleção. A administração deste AcMo foi irrelevante para o desenvolvimento do DMID-CI, como será descrito em RESULTADOS.

O protocolo de administração dos AcMos, representado no esquema abaixo, consistiu de injeções i.p., nos seguintes dias: 10, 11, 12, 16 e 21, após a primeira injeção de CI. Os AcMos foram aplicados exclusivamente no Modelo II de DMID-CI (duas injeções de CI). O acompanhamento dos animais foi efetuado de maneira similar ao anteriormente descrito para os modelos de DMID-CI (cf 3.2).

Como o objetivo deste estudo foi o emprego destes AcMos, a título curativo do diabetes auto-imune, optou-se por iniciar o tratamento dez dias após a primeira administração de CI. Este intervalo de tempo foi escolhido pela presença de insulite de grau intenso (análise histológica dos pâncreas dos animais tratados com CI), e de DMID clínico em 11% das fêmeas e 3% dos machos, como será discutido em RESULTADOS.

PROTOCOLO DE INJEÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS



*= três animais foram sacrificados para estudos de: subpopulações linfocitárias (baço) e insulite (histologia/imuno-histoquímica de pâncreas).

3.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

O fenótipo das subpopulações linfocitárias, provenientes do baço dos camundongos NOD estudados, foi analisado por imunofluorescência, utilizando-se um citômetro de fluxo (FACScan: Beckton-Dickinson, Mountain View, EUA), equipado com argônio-laser de 488 nm.

Os linfócitos esplênicos foram isolados, após homogeneização mecânica dos baços em meio Hanks (sem Ca^{++} e Mg^{++}) com 5% SBF (Soro Bovino Fetal), e filtração em membrana de "nylon" estéril, sobre gelo. Após centrifugar 10 minutos (min) a 800 g/min, a 4°C, o precipitado foi ressuscitado em 0,5 ml de meio e novamente centrifugado. O precipitado foi, então, submetido à hemólise, adicionando-se 1 ml de Tampão ACK (NH_4Cl 0,155 M; KHCO_3 0,01 M; EDTA 0,0001 M), durante 1 a 2 min, sobre gelo. Completando-se com meio, a solução foi centrifugada 10 min a 800 g/min, a +4°C. O precipitado foi ressuscitado em meio e analisaram-se numeração e viabilidade celulares por meio de azul Trypan. Após contagem, as células foram adaptadas à concentração de $10 \times 10^6/\text{ml}$.

A marcação das células em suspensão foi realizada em placa de 96 poços (Greiner, fundo redondo), sobre gelo. Após depositar 100 μl da suspensão celular/poço, a placa foi centrifugada 1 min a 800 g, a 4°C. Descartado o sobrenadante, as células foram lavadas em meio e a centrifugação repetida. Os precipitados foram, então, incubados com os diferentes anticorpos (Acs), durante 30 min. Utilizaram-se 20 μl de Ac para as marcações simples e 10 μl para as duplas. As células foram lavadas em meio Hanks com 5% de Solução de Azida a 4% (PBS) e centrifugadas (duas vezes). Os Acs biotinilados foram detectados com PE ("phycoerythrin")-streptavidina (Caltag, San Francisco, EUA), procedendo-se a uma segunda incubação de 30 min. Os precipitados, após a última lavagem, foram ressuscitados em 300 μl de Solução Fixadora (PBS 10X, com 2,5% de formaldeído) e as marcações foram analisadas em FACScan. Os linfócitos foram discriminados de outras células, usando-se janelas, baseadas em suas características de dispersão luminosa: FSC ("forward scatter") e SSC ("side scatter").

Citam-se, abaixo, os anticorpos utilizados para as marcações das subpopulações linfocitárias:

Híbridoma	Especificidade
1) 145-2C11-FITC IgG de hamster (fornecido por J. BLUESTONE)	CD3 (cadeia ϵ) camundongo
2) H57 597-Biotinilado IgG de hamster	TCR (fragmento constante da cadeia β) camundongo
3) GK-1.5-FITC IgG2b de rato (Becton Dickinson, Montain View, EUA)	CD4 camundongo
4) Lyt.2-PE IgG2b de rato (Caltag, San Francisco, EUA)	CD8 camundongo
5) Anti-soro (GAM) IgG de cabra-FITC (Biosys, Compiègne, França)	IgG (cadeias leve e pesada) camundongo
6) MARK-1-FITC IgG de camundongo (Caltag, San Francisco, EUA)	Ig (cadeia leve k) rato

O Ac não comercial, 145-2C11, foi purificado e conjugado à FITC ("fluorescein isothiocyanate"), no laboratório INSERM U-25.

3.5. HISTOLOGIA

Os pâncreas dos animais sacrificados, no decorrer deste estudo, foram depositados em cápsulas de congelação (Cryomold Biopsy: Miles Lab Teck Division), recobertos com um meio de conservação (Tissue-teck II, O.C.T.: Miles Lab Teck Division)

conservados a -80°C. Cortes seriados de pâncreas, de 5 µm de espessura, foram realizados em criostato (Reichert, RFA) à -20°C e recuperados em lâminas. Após secagem em temperatura ambiente durante 2 a 18 horas, os cortes foram fixados por 10 min em banho de acetona, e as lâminas conservadas a -80°C. O estudo histológico dos pâncreas foi efetuado sobre os cortes, após coloração por Hematoxilina-Eosina Safrão (H.E.S), que consistiu em: Hematoxilina de Harris 0,6% (Reactifs Ral S.A.) para a coloração do núcleo, Eosina aquosa 1% (Reactifs Ral S.A.) para a coloração do citoplasma, Safrão alcoólico 2% (Prolabo) para a coloração das proteínas do tecido conjuntivo, como colágeno e fibronectina. Após a coloração, os cortes foram desidratados e, as lâminas, montadas num meio de inclusão rápida para microscopia óptica (Entellan, Merck), foram conservadas a temperatura ambiente.

O estudo histológico consistiu na avaliação do infiltrado de células mononucleares das ilhotas de Langerhans do pâncreas. A qualificação do infiltrado foi realizada segundo uma série de cinco graus, G0 a G4, descritos abaixo:

- G0** : Ilhotas normais = ausência de infiltrado
- G1** : Periinsulite = mais de 25% da circunferência da ilhota contornada pelas células mononucleares
- G2** : Insulite invasiva = <80% da ilhota invadida por células mononucleares
- G3** : Insulite invasiva = >80% da ilhota invadida por células mononucleares
- G4** : Insulite destrutiva = invasão da ilhota, acompanhada de alterações profundas de sua arquitetura.

As ilhotas foram contadas e classificadas por grau, em duplo cego, em três planos de cortes diferentes/órgão. Os resultados foram representados como a média do número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, observadas em três camundongos, aleatoriamente, para cada grupo experimental.

3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Esta técnica foi realizada nos cortes de pâncreas congelados, com a finalidade de quantificar as células T (CD3+) e de diferenciar as duas subpopulações T: CD4+ e CD8+, presentes nos infiltrados das ilhotas.

Foi empregada uma técnica de imunoperoxidase indireta, em três camadas. O anticorpo secundário foi acoplado à biotina, permitindo a fixação de várias moléculas de estreptavidina-peroxidase, a fim de se amplificar o sinal. Aproximadamente 80 µl de cada AcMo: antiCD3, antiCD4 ou antiCD8, foram adicionados à cada corte e incubados durante 45 min, em temperatura ambiente, em câmara úmida, protegida contra a luminosidade. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes, durante 5 min, em tampão TBS ("Tris Buffered Saline") e uma vez em tampão TBS com 1% BSA ("Bovine Serum Albumin"). Em seguida, 80 µl de anticorpo secundário, biotilado, específico, foi adicionado e incubado durante 30 min, nas mesmas condições descritas anteriormente. Finalmente, 80 µl de estreptavidina-peroxidase (diluição: 1/20; concentração final: 20 µg/ml) foram adicionados e os cortes incubados durante 30 min, sempre nas mesmas condições. Depois da lavagem em TBS, a peroxidase foi revelada com uma solução de AEC (3-Amino 9-Ethylcarbazole: Sigma, St.Louis, EUA), preparada em tampão acetato e água oxigenada, desenvolvendo-se a reação em 7 min. Após a lavagem, os cortes foram contracolorados durante 15 segundos, utilizando-se uma solução de hematoxilina diluída ao meio. As lâminas foram, então, lavadas com água, secadas ao ar durante 2 horas e montadas em um meio aquoso (Aquamont: Gurr). Os cortes de pâncreas, assim preparados, foram conservados em câmara escura, a 4°C.

Os anticorpos primários, utilizados para a marcação específica das moléculas CD3, CD4 e CD8, assim como os anticorpos secundários, empregados em imunohistoquímica estão descritos a seguir.

Hibridoma	Especificidade	Diluição	Concentração Final (µg/ml)
Anticorpos primários			
1) 145-2C11 hamster	CD3 camundongo	1/2	50,0
	CD4	1/100	1,9
2) GK.1.5 biotinilado, rato	camundongo CD8	1/500	70,6
3) YTS-169.4.2 rato	camundongo		
Anticorpos secundários			
1) MARK-1 biotinilado, camundongo (Caltag, San Francisco, EUA)	Ig: cadeia leve k rato	1/20	50,0
2) GAH biotinilado, cabra (Caltag)	Ig: cadeias L+P hamster	1/20	200,0

A imunorreatividade à insulina, das células β pancreáticas, foi avaliada, em imuno-histoquímica, através de soro, de porco da índia, antiinsulina porcina (DAKO, Carpinteria, EUA), revelado diretamente com estreptavidina peroxidase.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência acumulada do DMID clínico foi comparada entre grupos através do teste X^2 .

Os graus de estadiamento da insulite foram avaliados por teste paramétrico, utilizando-se análise da variância.



4. Resultados

4.1. CARACTERÍSTICAS DO DIABETES ACELERADO PELA CICLOFOSFAMIDA (DMID-CI)

4.1.1. Perfil e evolução do DMID-CI clínico

A administração de ciclofosfamida (CI), na dose de 200 mg/kg/dose/animal, via i.p., foi realizada em camundongos NOD machos e fêmeas de oito semanas de vida, período de início de insulite, não associado com anomalias metabólicas, como hiperglicemia e glicosúria.

Os resultados da frequência do DMID clínico, no Modelo I: uma injeção de CI, estão representados na [Figura 5](#). Observou-se que, 44% das fêmeas (8/18) e 39% dos machos (7/18) desenvolveram DMID, três semanas após a injeção de CI. Estas cifras permaneceram estáveis até o final do acompanhamento dos animais, período em que se encontravam com doze semanas de vida. O aparecimento do DMID clínico mostrou-se relevante, porém, desde a segunda semana após a administração da droga, quando foi diagnosticado em 39% das fêmeas (7/18) e 33% dos machos (6/18), ambos com dez semanas de vida.

A frequência do DMID clínico foi, contudo, significativamente aumentada pela injeção de uma segunda dose de CI, catorze dias após a primeira (Modelo II), tanto em machos ($p < 0,001$), quanto em fêmeas ($p < 0,003$) ([Figura 6](#)). Observou-se 83% das fêmeas (30/36) e 77% dos machos (77/100), diabéticos, ao término do estudo, quatro semanas após a última injeção de CI, quando apresentavam idade de catorze semanas. O importante aumento do número de animais diabéticos ocorreu duas semanas após a segunda injeção de CI. Neste momento, 81% das fêmeas (29/36) e 66% dos machos (66/100) desenvolveram DMID.

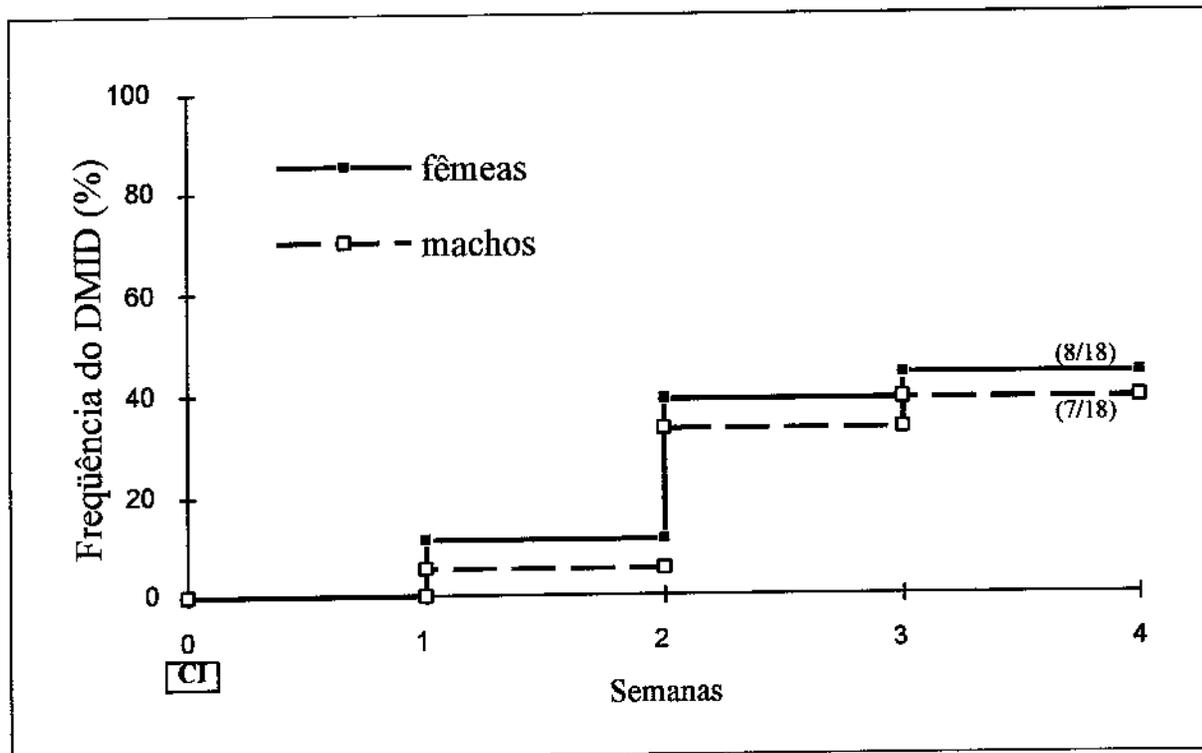


Figura 5: **Frequência do DMID clínico, em camundongos NOD, no Modelo I: uma injeção de ciclofosfamida (CI).** Animais NOD, de 8 semanas de idade, receberam uma injeção de ciclofosfamida (CI) (200 mg/kg, i.p.). Os dados expressam a frequência do DMID após a administração de CI, em machos (□) e fêmeas (■). Entre parênteses, está indicado o número de animais diabéticos sobre o total de animais de cada grupo experimental.

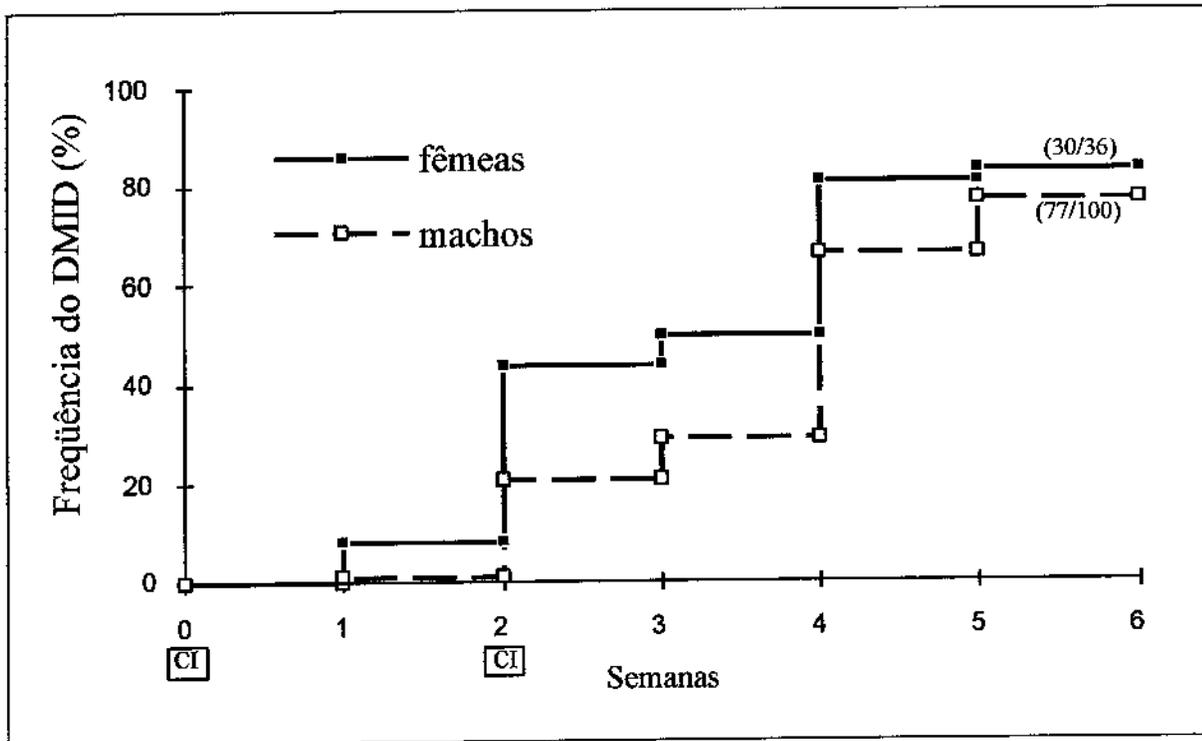


Figura 6: **Frequência do DMID clínico, em camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI).** Animais NOD, de oito semanas de idade, receberam duas injeções de ciclofosfamida (CI) (200 mg/kg, i.p.), no intervalo de catorze dias. Os dados expressam a frequência do DMID após a administração de CI, em machos (□) e fêmeas (■). Entre parênteses, está indicado o número de animais diabéticos sobre o total de animais dentro de cada grupo experimental.

A sobrevida dos animais, nos dois modelos, uma vez diagnosticado o diabetes, foi de duas a quatro semanas, em ambos sexos. Ressalta-se que, a ciclofosfamida, um agente alquilante de DNA, é citotóxica à diversas células do organismo. Observou-se melena e hematúria em alguns animais, prováveis efeitos colaterais da droga, dose-dependentes. Isto, possivelmente associou-se a uma diminuição da sobrevida dos animais que não desenvolveram diabetes, que foi de sete a oito semanas após a primeira injeção de CI. Os animais não diabéticos, que apresentaram morte súbita, foram eliminados dos cálculos estatísticos, por falta de estudo preciso da causa *mortis*.

4.1.2. Perfil e evolução do fenótipo dos linfócitos esplênicos

A) Modelo I: uma injeção de ciclofosfamida (CI)

A análise dos esplenócitos, população linfocitária estudada, por imunofluorescência em citometria de fluxo, revelou que uma injeção de CI provocou depleção de linfócitos B (L.B), similar em NOD machos e fêmeas de oito semanas de vida. A Figura 7 (A) representa, em números relativos, a evolução quantitativa semanal de L.B, ao longo do estudo. Os linfócitos B, portadores de imunoglobulinas de superfície, representaram, em valor relativo, $54,0\% \pm 2,2\%$ ($x \pm SD$; $n = 4$) dos esplenócitos de NOD machos e fêmeas, antes do início do experimento. Detectaram-se, na primeira semana após a administração de CI, 51% de depleção celular B, nível máximo observado durante o estudo (L.B = $26,5\% \pm 2,6\%$; $n = 4$). Ocorreu reconstituição lenta e parcial dos linfócitos B, até o final do período de acompanhamento dos animais (quatro semanas), persistindo-se um nível de depleção de 42% (L.B = $31,5\% \pm 1,9\%$; $n = 4$).

Os linfócitos T CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ representaram, em valor relativo, $37,5\% \pm 1,9\%$ ($n = 4$) dos esplenócitos de NOD machos e fêmeas, antes do início do experimento. Contrastando com a depleção celular B, observou-se, como representado na Figura 7 (B), um aumento na proporção de L.T ($51,3\% \pm 16,0\%$; $n = 4$) logo na primeira semana após a administração de CI. Este aumento poderia significar uma reação de repopulação de L.T,

depois de possível depleção, ocorrida antes do sétimo dia após a injeção de CI. Se esta hipotética depleção T ocorrer, seria um evento precoce e transitório. Segundo a cinética de análise semanal adotada, detectou-se diminuição de L.T ($27,3\% \pm 5,6\%$) na segunda semana após CI, havendo reconstituição rápida e completa do "pool" T CD3+ a β + esplênico, nas duas semanas subsequentes.

B) Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI)

A administração de uma segunda injeção de CI, catorze dias após a primeira, não modificou, de forma profunda, a evolução do perfil fenotípico dos linfócitos esplênicos B e T, descrito no Modelo I. Como representado na Figura 8 (A), a principal diferença consistiu no agravamento da depleção celular B, como consequência da segunda dose de CI. Uma semana após esta última dose de CI (semana 3 do protocolo experimental), observamos um nível médio de 69% de depleção de L.B ($16,7\% \pm 2,2\%$; n = 4). Ocorreu, porém, reconstituição parcial do "pool" B esplênico, quatro semanas após a segunda injeção de CI, em ambos os sexos. Neste momento, (semana 6 do protocolo experimental), a depleção celular B foi, em média, de 29% (L.B = $38,3\% \pm 4,5\%$; n=4).

Por outro lado, observou-se no Modelo II, como encontrado no Modelo I, um aumento do número relativo de L.T, baseando-se na cinética de análise fenotípica semanal. A Figura 8 (B) mostra um aumento médio de 25% (L.T = $50,3\% \pm 3,7\%$; n = 4) ao término do estudo, em comparação aos valores obtidos antes da primeira dose de CI (L.T = $37,5\% \pm 1,9\%$; n = 4).

Em razão do Modelo II ter sido utilizado como controle das experiências de imuno-intervenção com os AcMos, foi também avaliada a evolução semanal do fenótipo das subpopulações T CD3+ esplênicas CD4+ e CD8+ (Figura 9). Os animais NOD machos e fêmeas, tratados com CI, não apresentaram modificação significativa dos valores relativos de L.T CD4+ ou CD8+. Ocorreu um aumento proporcional destas subpopulações, que acompanhou o aumento do número relativo de células T, acima descrito, com exceção

da diminuição observada na segunda semana após a primeira dose de CI. A cinética da relação CD4:CD8, detalhada na [Figura 9](#), não apresentou diferenças importantes durante o período experimental. Observou-se, contudo, no momento da referida diminuição de L.T, um aumento virtual desta relação (CD4:CD8 = 3,8, comparado ao valor de 2,8 no dia 0 do protocolo), decorrente de uma diminuição relativa de células T CD8+. Estão representadas, na [Figura 10](#), imagens obtidas em citometria de fluxo da marcação por imunofluorescência, para detecção de esplenócitos B (Ig+), T (CD3+), e das subpopulações T CD4+ e CD8+, no Modelo II (dia 0, semanas 3 e 6).

4.1.3. Perfil e evolução da insulite: aspectos histológicos

Para fins de análise e representação gráfica dos resultados, os graus de insulite, descritos em MATERIAL E MÉTODOS (cf 3.5), foram reagrupados. Este estadiamento teve como base o estudo histológico da ilhota, de forma convencional (coloração com hematoxilina/eosina), e a presença de células insulares contendo insulina, identificadas por imuno-histoquímica (marcação das ilhotas com anticorpo antiinsulina).

Os diferentes graus da infiltração insular, representados na [Figura 11](#), foram classificados nos estádios consecutivos:

- G0 + G1:** ilhota normal ou com células linfomononucleares em periferia (periinsulite); a imunomarcação da ilhota com anticorpo antiinsulina foi compatível com o achado de uma ilhota normal.
- G2 + G3:** ilhota com insulite invasiva, mas com arquitetura conservada; a presença de células insulares com imunomarcação positiva para insulina foi diminuída, em comparação ao estágio anterior.
- G4:** ilhota com insulite invasiva maciça e decomposição de sua arquitetura; não foram observadas células insulares com imunomarcação positiva para insulina.

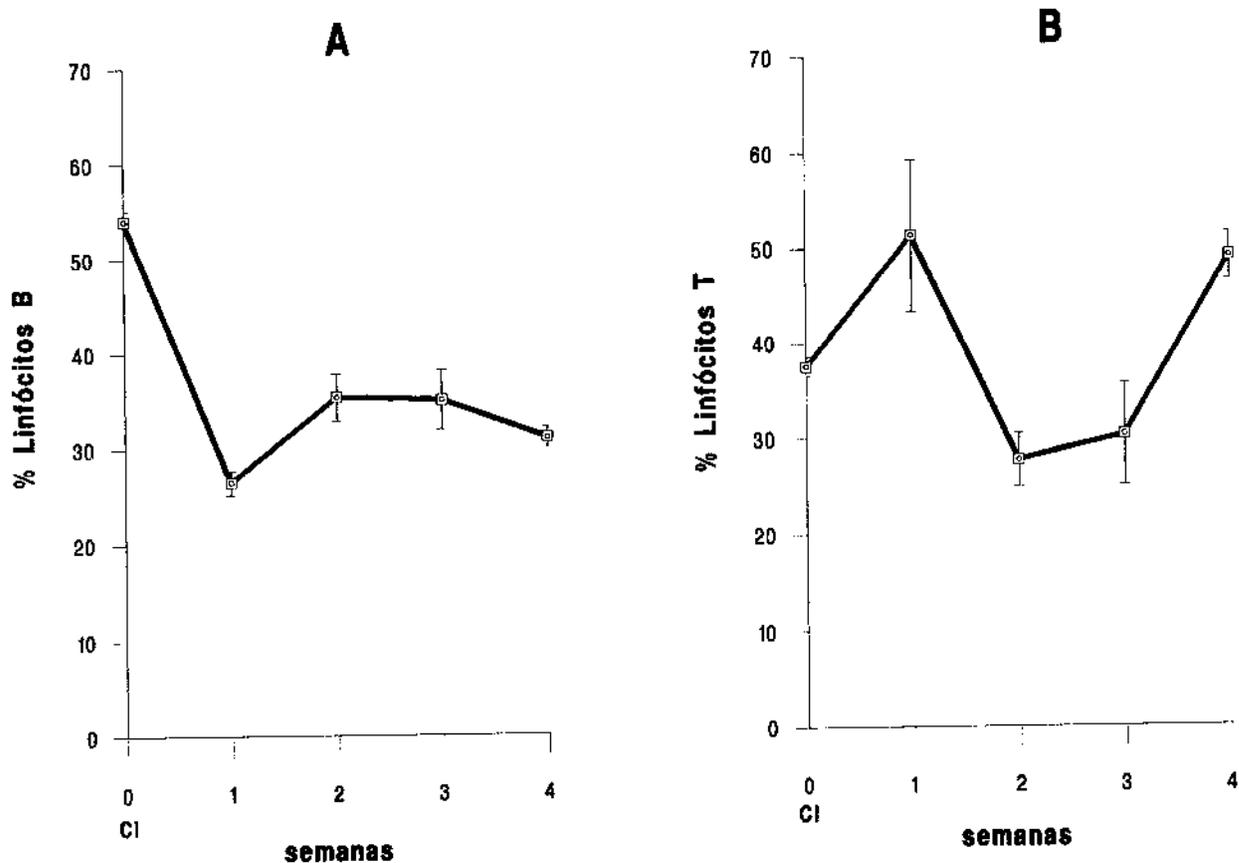


Figura 7: % de Linfócitos B (A) e T (B) esplênicos, de camundongos NOD, no Modelo I: uma injeção de ciclofosfamida (CI). Análise cinética, semanal, em citometria de fluxo, do número relativo médio de linfócitos B e T ($x \pm SD$). Baços de 4 animais (2 fêmeas e 2 machos) foram analisados/semana. Linfócitos B (A): dia 0: 54,0% \pm 2,2%; sem 1: 26,5% \pm 2,6%; sem 2: 35,3% \pm 5,0%; sem 3: 35,0% \pm 6,3%; sem 4: 31,5% \pm 1,9%. Linfócitos T (B): dia 0: 37,5% \pm 1,9%; sem 1: 51,3% \pm 16,0%; sem 2: 27,3% \pm 5,6%; sem 3: 30,3% \pm 10,5%; sem 4: 49,0% \pm 5,0%.

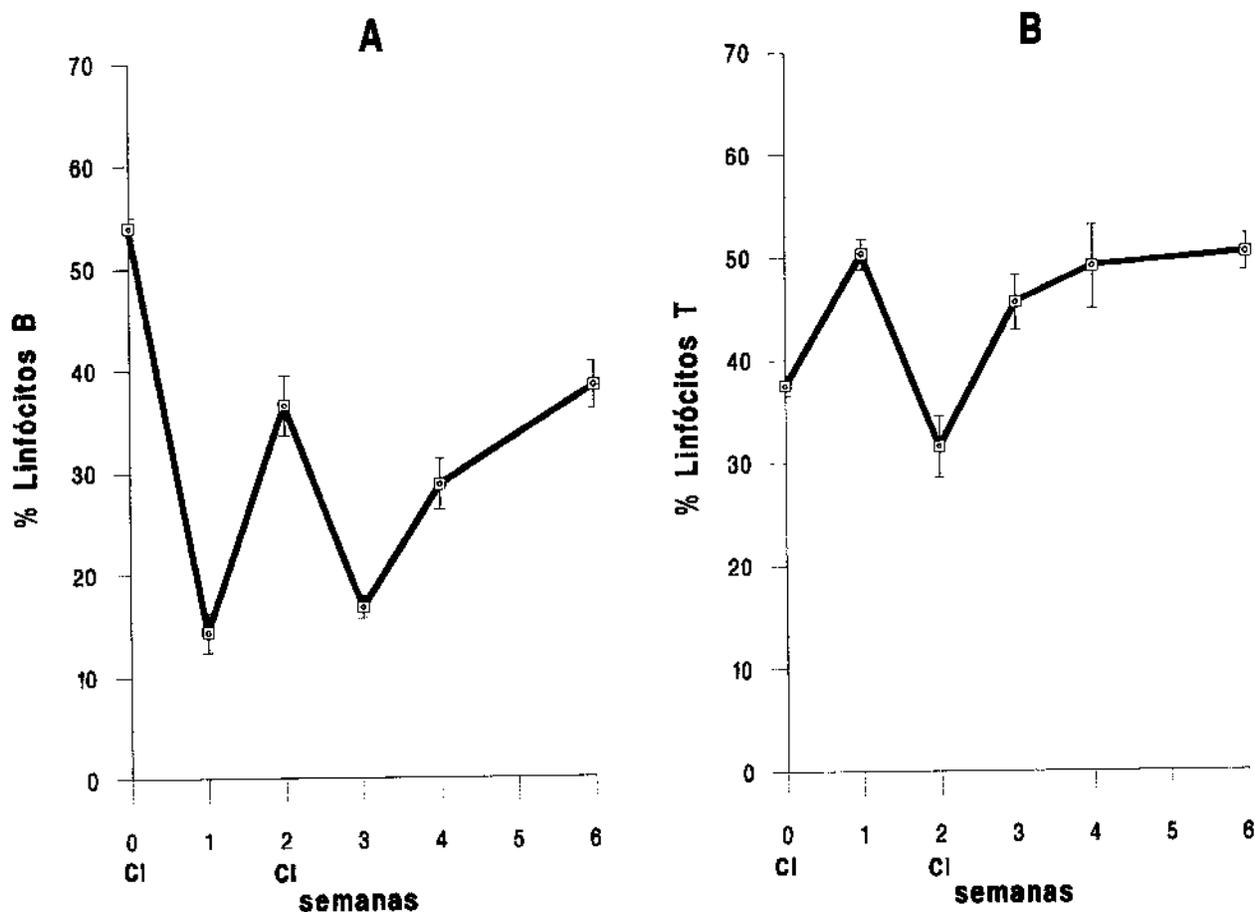


Figura 8: % de Linfócitos B (A) e T (B) esplênicos, de camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI). Análise cinética, semanal, em citometria de fluxo, do número relativo de linfócitos B ($x \pm SD$). Baços de 4 animais (2 fêmeas e 2 machos) foram analisados/semana. Linfócitos B (A): dia 0: 54,0% \pm 2,2%; sem 1: 14,3% \pm 3,8%; sem 2: 36,5% \pm 4,1%; sem 3: 16,7% \pm 2,2%; sem 4: 28,7% \pm 5,0%; sem 6: 38,3% \pm 4,5%. Linfócitos T (B): dia 0: 37,5% \pm 1,9%; sem 1: 49,7% \pm 2,4%; sem 2: 31,5% \pm 6,0%; sem 3: 45,5% \pm 5,5%; sem 4: 49,0% \pm 8,1%; sem 6: 50,3% \pm 3,7%.

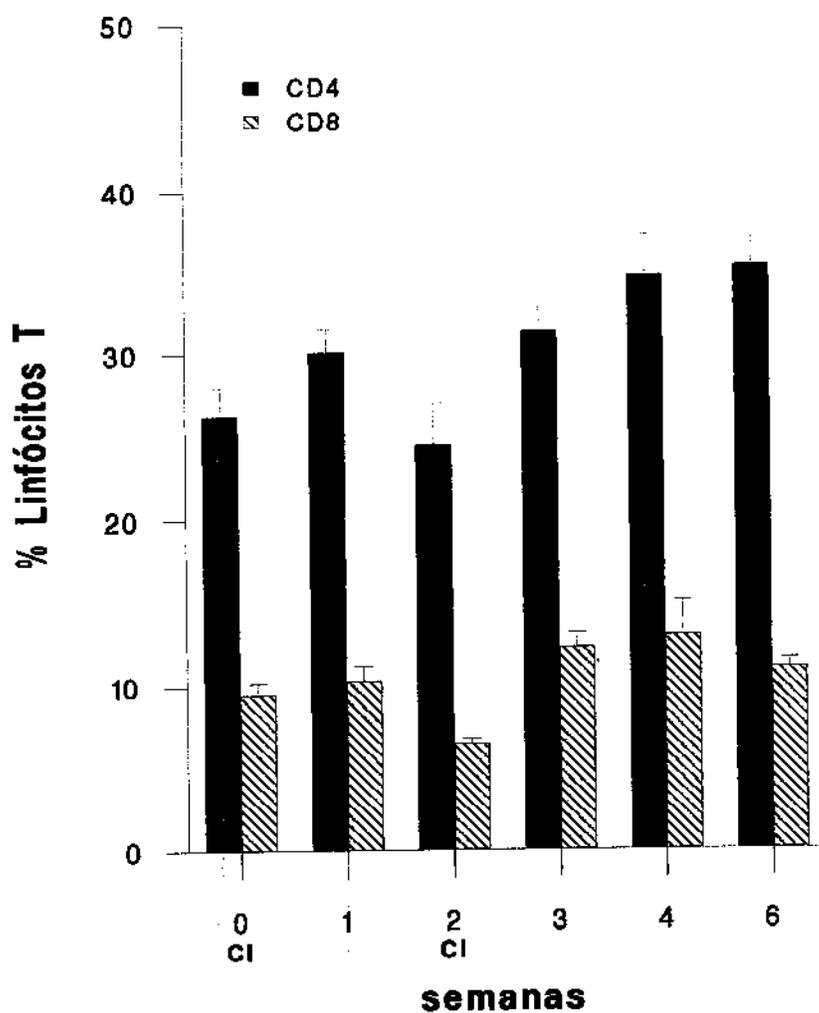


Figura 9: Subpopulações T CD4+ e CD8+, em baço, de camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CF). Análise cinética, semanal, em citometria de fluxo, do número relativo de linfócitos T CD4+ e CD8+ ($x \pm SD$). Baços de 4 animais (2 fêmeas e 2 machos) foram analisados/semana.

	% T CD4+	% T CD8+	CD4:CD8
Dia 0	26,3 ± 3,3	9,5 ± 1,3	2,8
Semana 1	30,7 ± 2,9	10,3 ± 1,7	3,0
Semana 2	24,5 ± 5,1	6,5 ± 0,6	3,8
Semana 3	31,3 ± 3,0	12,3 ± 1,7	2,5
Semana 4	34,7 ± 5,0	13,0 ± 4,2	2,7
Semana 6	35,3 ± 4,0	11,0 ± 1,1	3,2

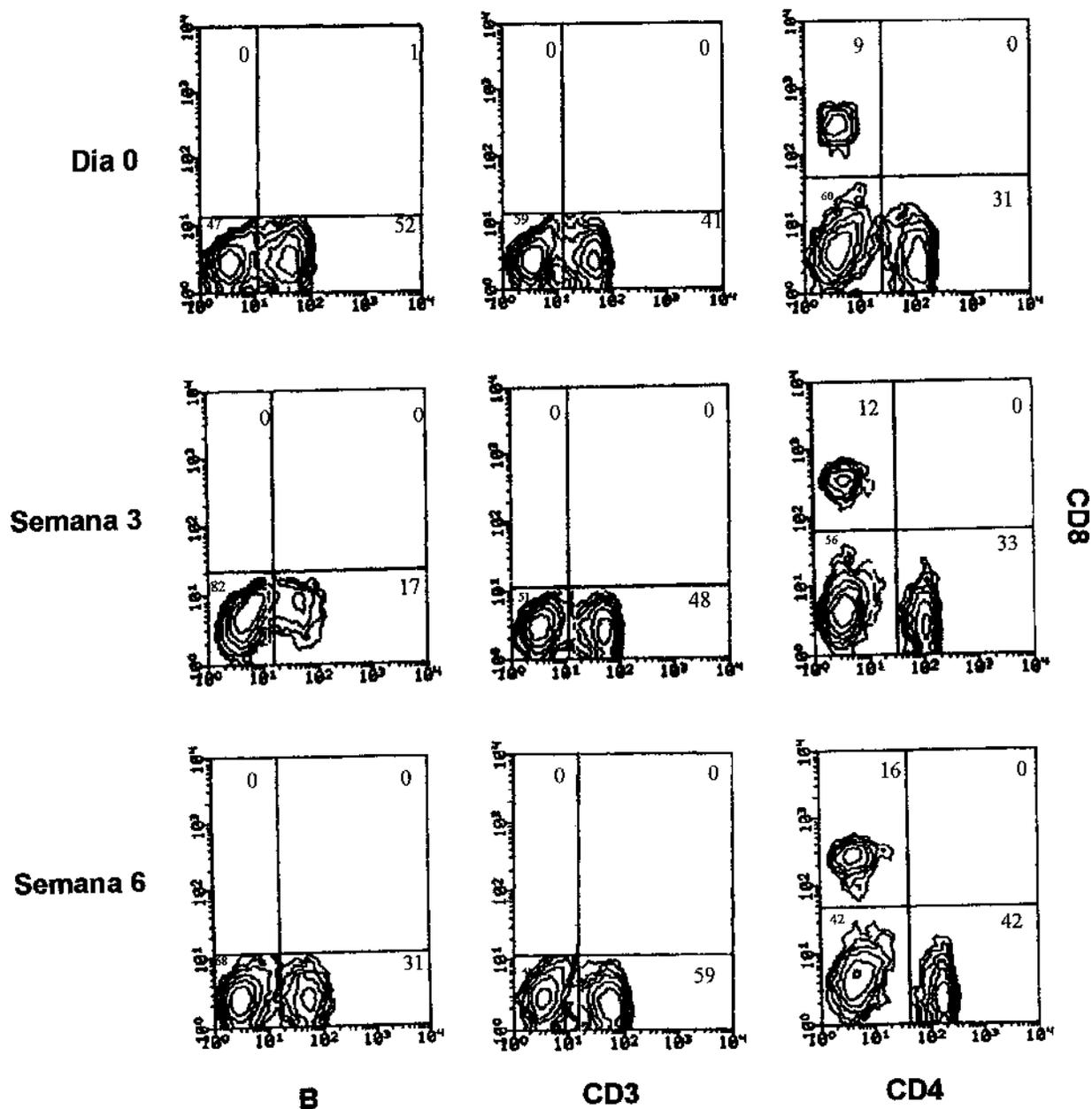


Figura 10: Marcação, por imunofluorescência, dos esplenócitos de camundongos NOD, no modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI). Os painéis representam "contour plots", obtidos em citometria de fluxo (FACScan) da marcação simples: linfócitos B (GAM-FITC) e T (145 2C11-FITC), e da marcação dupla: subpopulações T CD4+ (GK1.5-FITC) e CD8+ (Lyt.2-PE). Os números consistem da porcentagem de células marcadas/total de linfócitos, da análise individual, de camundongos NOD, nos períodos: dia 0 (NOD 1), semana 3 (NOD 2) e semana 6 (NOD 3).

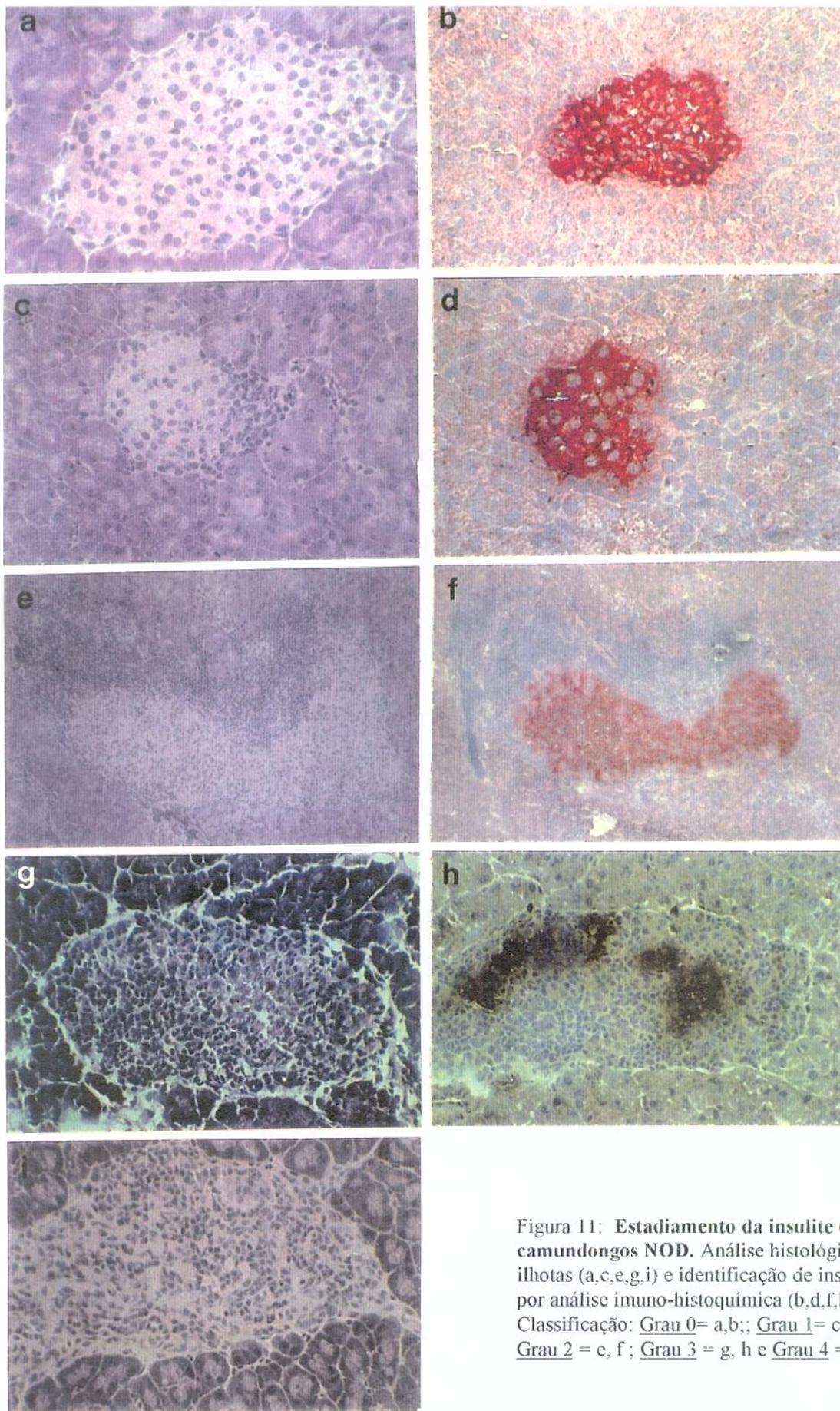


Figura 11: **Estadiamento da insulite em camundongos NOD.** Análise histológica de ilhotas (a,c,e,g,i) e identificação de insulina, por análise imuno-histoquímica (b,d,f,h). Classificação: Grau 0= a,b;; Grau 1= c, d ; Grau 2 = e, f ; Grau 3 = g, h e Grau 4 = i.

O perfil da insulite, assim estadiada, foi similar em NOD machos e fêmeas que receberam CI. Por esta razão, os resultados foram expressados como a média dos dados de ambos sexos. Não foram observadas diferenças significativas, na cinética de evolução da insulite, entre os dois protocolos experimentais com ciclofosfamida. Tanto no Modelo I (Figura 12), quanto no Modelo II (Figura 13), as proporções de ilhotas apresentando os graus G0 + G1 e G2 + G3 caracterizaram-se por uma cinética inversa em função do tempo. Existiu, pois, uma diminuição progressiva do número de ilhotas normais ou com periinsulite e um aumento progressivo do número de ilhotas com insulite invasiva, promovendo um interessante aspecto em espelho das curvas representadas nas Figuras 12 e 13.

Observou-se, sobretudo, um momento preciso para tal variação do perfil de insulite. Este momento foi situado entre o sétimo e o décimo quarto dias após a primeira injeção de CI, precedendo a segunda dose de CI. Constatou-se, neste intervalo de tempo, uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) do número relativo de ilhotas normais ou periinfiltradas e, paralelamente, um aumento significativo ($p < 0,0004$) do número relativo de ilhotas com insulite invasiva.

A progressão da insulite para os estádios mais avançados foi acompanhada de uma diminuição do número de ilhotas contadas/pâncreas. Apesar de não ter sido utilizada metodologia para sua quantificação precisa, este número reduziu-se em 47% e 41%, quatro semanas após a primeira injeção de CI, nos Modelos I e II, respectivamente (Figuras 12 e 13). Em decorrência desta variação do número de ilhotas contadas, foi representada a porcentagem de ilhotas infiltradas sobre a média do número total de ilhotas contadas/animal/período do estudo.

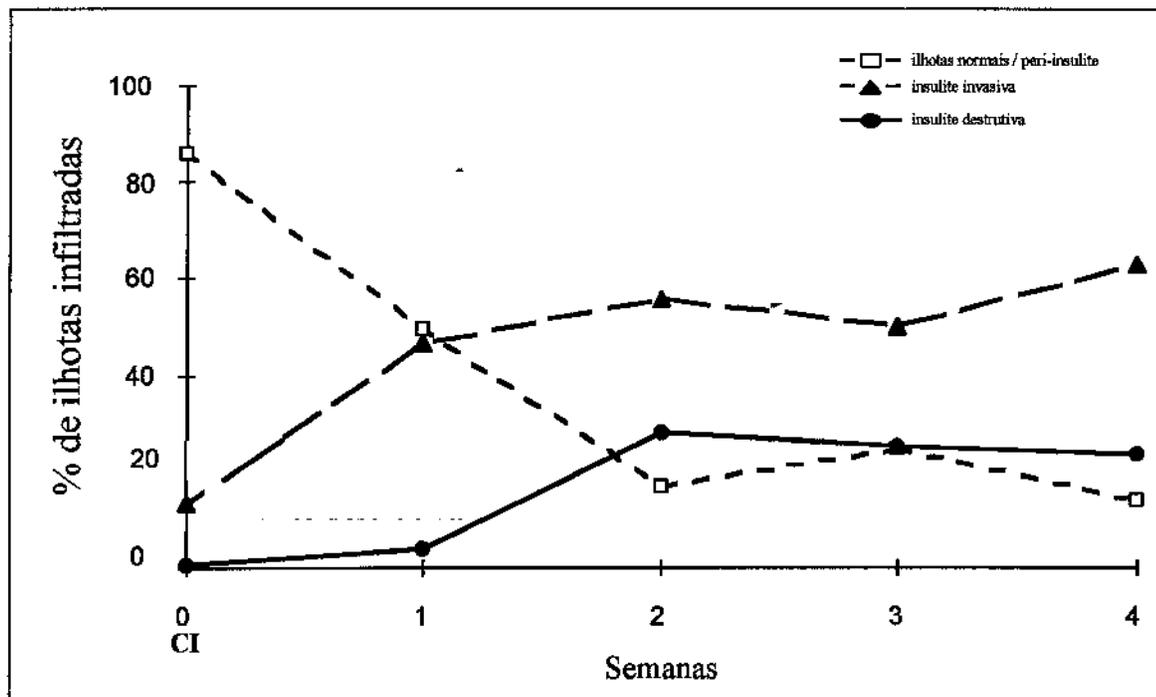


Figura 12: Perfil da insulite, em camundongos NOD, no Modelo I: uma injeção de ciclofosfamida (CI). Porcentagem de ilhotas com diferentes graus histológicos de insulite/total de ilhotas contadas por animal, em função do tempo de estudo, em grupos de 6 animais (3 machos e 3 fêmeas)/semana. As cifras correspondentes à porcentagem de ilhotas ($x \pm SEM$)/grau/animal, e o número absoluto médio de ilhotas contadas/animal são:

Tempo (semanas)	Ilhotas normais/periinsulite	Insulite invasiva	Insulite destrutiva	Total de ilhotas/animal
0	85,8 \pm 6,2	13,6 \pm 5,8	0,6 \pm 0,6	49
1	49,3 \pm 10,5	46,7 \pm 9,7	4,0 \pm 2,0	55
2	16,6 \pm 16,0	55,4 \pm 18,1	28,0 \pm 16,0	48
3	24,8 \pm 15,4	49,7 \pm 13,4	25,5 \pm 14,0	47
4	13,8 \pm 11,5	62,7 \pm 16,2	23,5 \pm 15,7	26

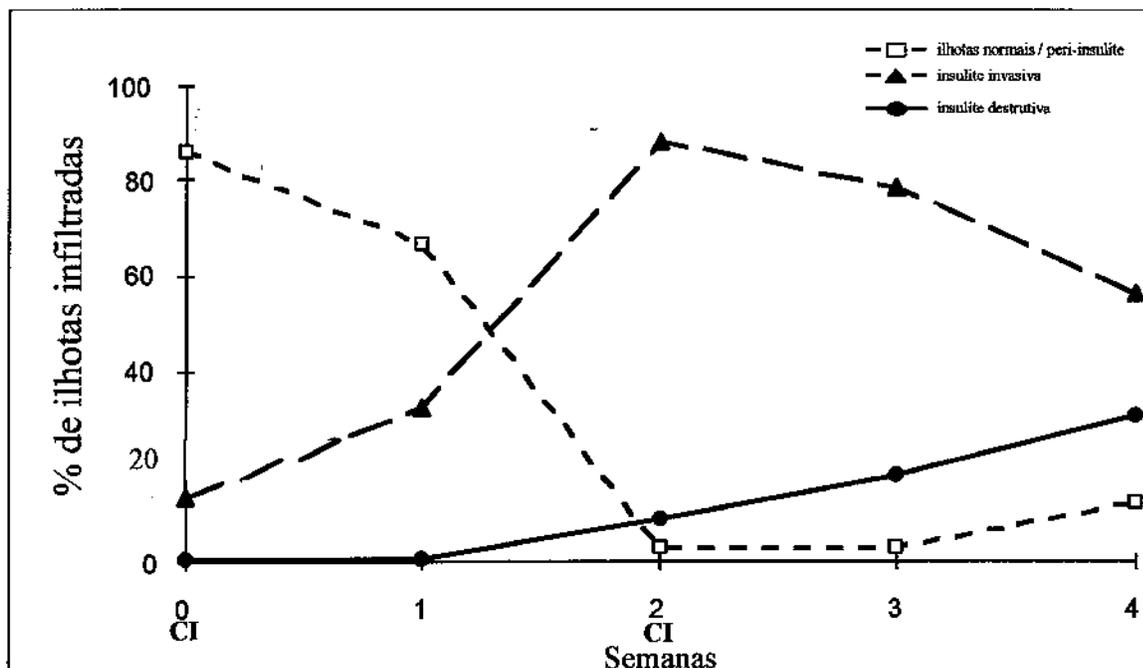


Figura 13: Perfil da insulite, em camundongos NOD, no Modelo II: duas injeções de ciclofosfamida (CI). Porcentagem de ilhotas com diferentes graus histológicos de insulite/total de ilhotas contadas por animal, em função do tempo de estudo, em grupos de 6 animais (3 machos e 3 fêmeas)/ semana. As cifras correspondentes à porcentagem de ilhotas ($x \pm SEM$)/grau/animal, e o número absoluto médio de ilhotas contadas/animal são:

Tempo (semanas)	Ilhotas normais/periinsulite	Insulite invasiva	Insulite destrutiva	Total de ilhotas/animal
0	85,8 ± 6,2	13,6 ± 5,8	0,6 ± 0,6	49
1	66,9 ± 13,6	32,4 ± 13,2	0,7 ± 0,7	43
2	2,8 ± 1,8	88,1 ± 2,9	9,1 ± 7,1	67
3	3,2 ± 2,0	78,7 ± 6,2	18,1 ± 6,0	31
4	12,9 ± 9,7	56,5 ± 15,2	30,6 ± 17,2	29

O perfil de insulite, induzido pela ciclofosfamida (Modelos I e II), foi comparado ao desenvolvido espontaneamente em camundongos NOD desta colônia. Na Figura 14, estão representados os perfis de evolução da insulite espontânea, do ponto de vista histológico, em fêmeas (A) e machos (B), avaliados nas seguintes idades: 12, 16 e 20 semanas de vida.

Observou-se que, o perfil de evolução da insulite espontânea, desenvolvida pelas fêmeas NOD (Figura 14A), foi similar ao induzido nos animais NOD pela CI (Modelos I e II; figuras 12 e 13). Entretanto, este perfil foi deslocado no tempo, conforme a idade dos animais, visto que a insulite espontânea progride mais lentamente. Assim, foi em torno da 16ª semana de vida das fêmeas NOD que ocorreu um aumento do número de ilhotas em estádios mais avançados de insulite (G2 + G3 e G4), em relação ao de ilhotas normais/periinsulite (G0 + G1). O mesmo não ocorreu em NOD machos (Figura 14B), que desenvolvem raramente o DMID clínico, de forma espontânea, nesta colônia. Estes animais apresentaram periinsulite e baixa proporção de ilhotas com insulite invasiva, de forma estável, de acordo com as idades estudadas, com não progressão ao estágio final de insulite destrutiva.

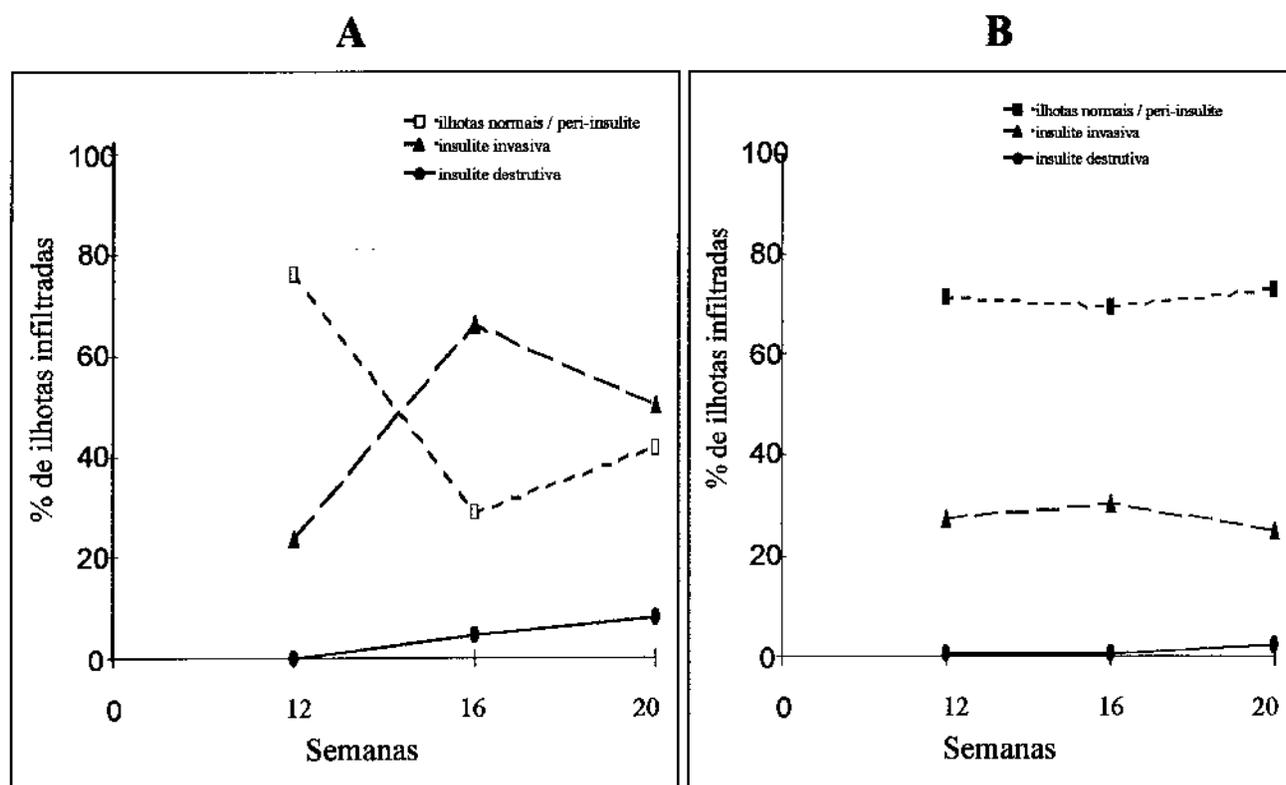


Figura 14: Perfil da insulite espontânea em NOD fêmeas (A) e machos (B). Porcentagem de ilhotas com diferentes graus histológicos de insulite/total de ilhotas contadas por animal, em grupos de 3 animais/idade (12, 16 e 20 semanas). As cifras correspondentes à porcentagem de ilhotas ($x \pm SEM$)/grau/animal e o número absoluto médio de ilhotas contadas/animal são:

Idade (semanas)	Ilhotas normais/periinsulite	Insulite invasiva	Insulite destrutiva	Total de ilhotas/animal
FÊMEAS (A)				
12	76,2 \pm 15,9	23,8 \pm 15,9	0	44
16	29,1 \pm 11,8	66,3 \pm 13,0	4,6 \pm 3,7	39
20	41,7 \pm 29,6	50,0 \pm 25,3	8,3 \pm 4,3	34
MACHOS (B)				
12	71,0 \pm 8,5	27,3 \pm 7,7	0,7 \pm 0,7	40
16	69,4 \pm 12,9	30,0 \pm 13,2	0,6 \pm 0,6	45
20	72,9 \pm 13,5	24,8 \pm 12,4	2,3 \pm 1,2	46

4.1.4. Fenótipo da insulite: aspectos imuno-histoquímicos

O fenótipo das células do infiltrado insular, induzido nos animais NOD pela CI, caracterizado por imuno-histoquímica, foi similar ao descrito em insulite espontânea (KIKUTANI & MAKINO, 1992). A Figura 15 representa uma ilhota com insulite invasiva (G2) de animal do grupo DMID-CI, com predomínio de células T CD3+, CD4+ e CD8+.

Foi, também, realizada uma análise qualitativa do fenótipo das subpopulações T CD4+ e CD8+, segundo o grau de infiltração insular, no Modelo DMID-CI. A Figura 16 representa os achados obtidos em pâncreas de camundongos NOD machos e fêmeas do Modelo I. Ressalta-se, sobretudo, que esta evolução fenotípica da insulite foi observada, de forma similar, no Modelo II, independentemente do período em que os animais encontravam-se nos protocolos experimentais. Observou-se, então, que a periinsulite (Figura 16: NOD 1) e o início da insulite invasiva (NOD 2) caracterizaram-se pelo predomínio de células T CD4+. A medida em que o infiltrado estendeu-se na ilhota (NOD 3), notou-se, então, um aumento da proporção de células CD8+, que se tornou equivalente ao de células CD4+.

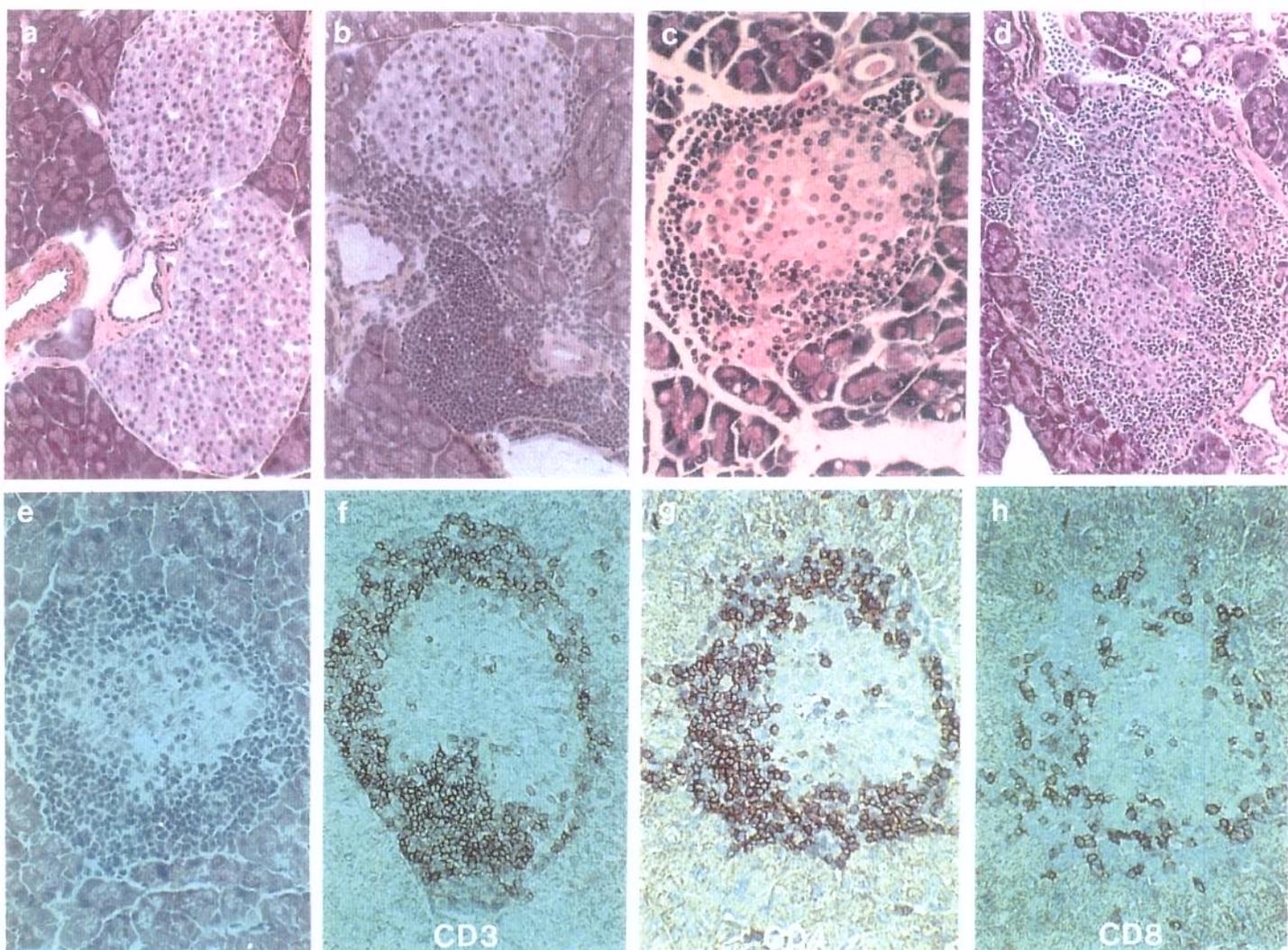


Figura 15: Análise histológica e imuno-histoquímica da insulite, induzida pela ciclofosfamida, em camundongos NOD. Análise histológica de ilhotas: (a) grau 0; (b) grau 1; (c) grau 2; (d) grau 3, e análise imuno-histoquímica das células mononucleares infiltrantes de uma ilhota com grau 2 (e), com os Acs: (f) antiCD3; (g) antiCD4; (h) antiCD8.

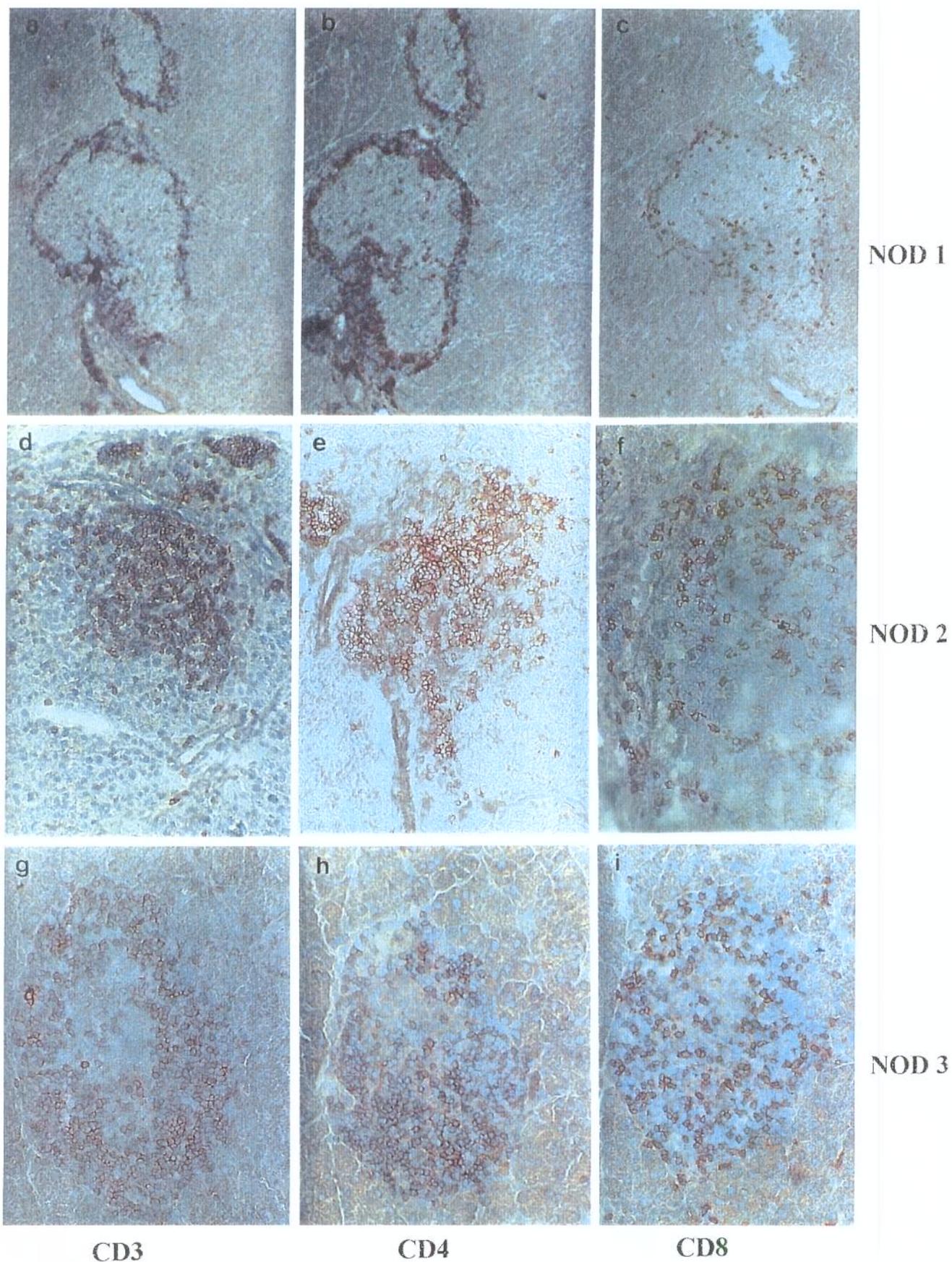


Figura 16: Subpopulações T CD4+ e CD8+ em diferentes estádios da insulite induzida pela ciclofosfamida (CI) em camundongos NOD. Análise imuno-histoquímica de ilhotas com os Acs: antiCD3 (a, d, g), antiCD4 (b, e, h) e antiCD8 (c, f, i), de diferentes animais tratados com uma injeção de CI. NOD 1: macho, insulite grau 1; NOD 2: fêmea, insulite grau 2; NOD 3: fêmea, insulite grau 3.

4.2. PROTOCOLO DE TRATAMENTO DO DMID-CI COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTICD4 E ANTICD8

O modelo de DMID, induzido por duas injeções de ciclofosfamida, no camundongo NOD (Modelo II), foi utilizado para avaliar o efeito terapêutico de anticorpos monoclonais (AcMos) depletantes das subpopulações de linfócitos T CD4+ ou CD8+. O protocolo de imuno-intervenção, descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (cf 3.3), foi aplicado numa janela terapêutica contemplada para o tratamento curativo do DMID, adotando-se exclusivamente a insulite como marcador da auto-imunidade. Assim sendo, baseando-se nos resultados histológicos de evolução da insulite no Modelo II (RESULTADOS, cf 4.1.3), optou-se por iniciar o tratamento com os AcMos dez dias após a primeira injeção de CI. Tratou-se de um momento importante na imunopatogênese do DMID-CI, no qual se observou uma infiltração intensa das ilhotas por células linfomononucleares (Figuras 12 e 13). Do ponto de vista clínico, em média, 11% da fêmeas e 3% dos machos desenvolveram o DMID, neste período (Figuras 5 e 6).

4.2.1. Tratamento com o AcMo depletante antiCD4: Y191

A) Efeito sobre o DMID-CI clínico

A Figura 17 detalha os resultados do tratamento com o AcMo depletante antiCD4 Y191 no desenvolvimento do DMID-CI clínico, em NOD machos e fêmeas. Os dados obtidos separadamente, em machos e fêmeas, foram similares e são representados de forma conjunta. Animais NOD de oito semanas de idade, que receberam duas injeções de CI, foram tratados com o AcMo antiCD4 Y191 nos dias: 10, 11, 12, 16 e 20, após a primeira injeção de CI. Cada animal recebeu 250 µg/ dose de Y191, cumulando uma dose total de 1,25 mg/animal. Dois grupos controles foram analisados: um grupo de NOD machos e fêmeas, que recebeu exclusivamente CI (CT-CI), e outro tratado com o AcMo de rato antiCD8 Y105, considerado como o AcMo controle irrelevante do experimento.

Como se observa na Figura 17, o AcMo Y191 tratou de forma eficaz o DMID-CI clínico do camundongo NOD. A frequência de desenvolvimento do DMID foi significativamente reduzida nos animais tratados com Y191: 30% (20/66) em comparação ao grupo CT-CI: 79% (107/136) ($p < 0,001$), ao final do experimento (semana 6). No grupo de animais tratados com o AcMo controle Y105, não se constatou efeito protetor do DMID-CI, já que 69% (63/92) dos animais desenvolveram a doença.

B) Efeito sobre o fenótipo dos linfócitos T esplênicos

A Figura 18 representa o efeito do tratamento com o AcMo antiCD4 Y191 sobre as subpopulações T CD4+ e CD8+ esplênicas. Como descrito em MATERIAIS e MÉTODOS (cf 3.3), a dose de cada AcMo, a ser administrada *in vivo*, foi determinada com base no grau de depleção de células alvo obtido. A análise sequencial do fenótipo dos linfócitos T esplênicos nos animais tratados com o AcMo Y191, confirmou a eficiência biológica desta imunoterapia. Para eliminar a variabilidade dependente do efeito do tratamento depletante sobre a população T CD3+, em comparação ao grupo controle (CT-CI), a porcentagem de depleção específica, no caso, da subpopulação CD4+, foi calculada, através da relação abaixo descrita, para cada tempo do protocolo estudado:

$$\% \text{ de depleção CD4} = \frac{\% \text{ CD4+}/\text{CD3+ no grupo Y191}}{\% \text{ CD4+}/\text{CD3+ no grupo CT-CI}}$$

O AcMo Y191 induziu uma depleção média de 83% de células T CD4+ periféricas, em NOD machos e fêmeas, avaliada um dia após a quinta e última injeção correspondente ao tratamento (semana 3 do protocolo). Após o final do tratamento com Y191, ocorreu uma reconstituição progressiva das células T CD4+, persistindo, porém, uma depleção média de 21% das mesmas, ao término do estudo (três semanas após a última injeção de Y191). A Figura 19 representa imagens obtidas em citometria de fluxo da marcação, por imunofluorescência, dos esplenócitos T CD4+ e CD8+, em camundongos NOD, tratados com Y191. Não se observou efeito de recobrimento linfocitário com Y191 (marcação com antiIg de rato), na análise semanal utilizada.

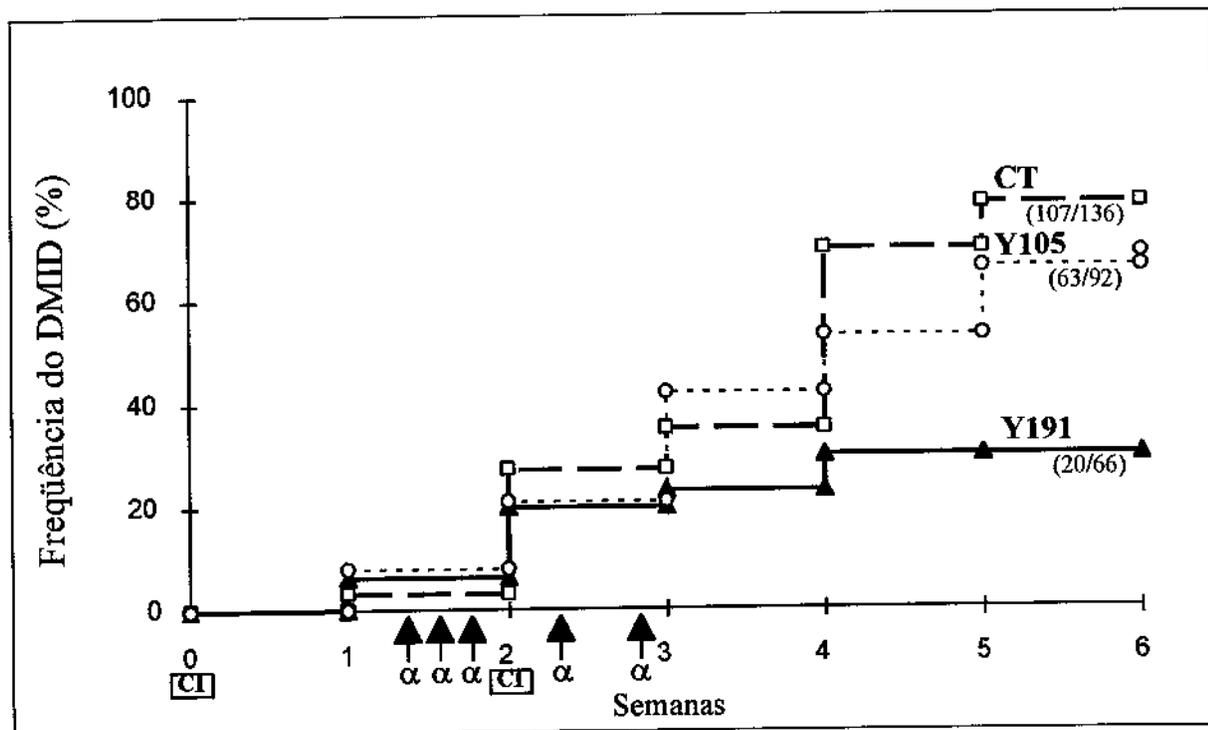


Figura 17: Tratamento do DMID-CI, do camundongo NOD, com AcMo antiCD4 depletante Y191. Animais NOD machos e fêmeas, de oito semanas de idade, foram injetados com ciclofosfamida (CI) (200 mg/kg, i.p.), no intervalo de catorze dias. 66 animais (34 fêmeas e 32 machos) foram tratados com Y191 (▲) (250 µg/dose, i.p.) (α) nos dias 10, 11, 12, 16 e 20. Grupos controles: CT-CI (□): animais que receberam unicamente CI; AcMo controle Y105 (○) (100 µg/dose). Uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o grupo tratado com Y191 e o grupo controle (CT-CI) ($p < 0,001$).

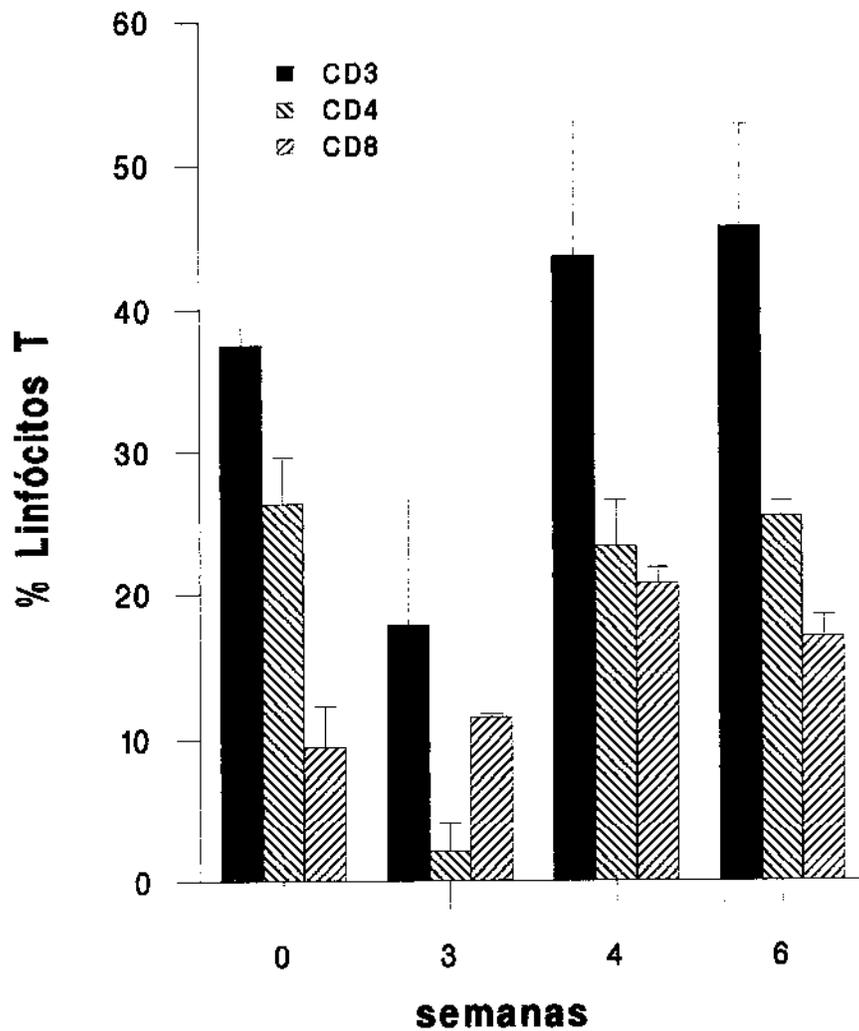


Figura 18: Efeito do tratamento com o AcMo antiCD4 depletante Y191 sobre o fenótipo das subpopulações T esplênicas CD4+ e CD8+. Análise cinética, em citometria de fluxo, do número relativo de linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ ($x \pm SD$). Baços de 4-6 animais (mínimo de 2 fêmeas e 2 machos), foram analisados/semana.

	% CD3+	% CD4+	% CD8+	CD4/CD8	% depl. CD4+
Dia 0	37,5 ± 1,9	26,3 ± 3,3	9,5 ± 1,3	2,8	-
Semana 3	17,8 ± 8,8	2,1 ± 2,0	11,5 ± 7,1	0,2	83,1
Semana 4	43,7 ± 9,5	23,3 ± 3,2	20,7 ± 5,7	1,1	25,1
Semana 6	45,7 ± 7,1	25,3 ± 1,1	17,0 ± 7,2	1,5	20,9

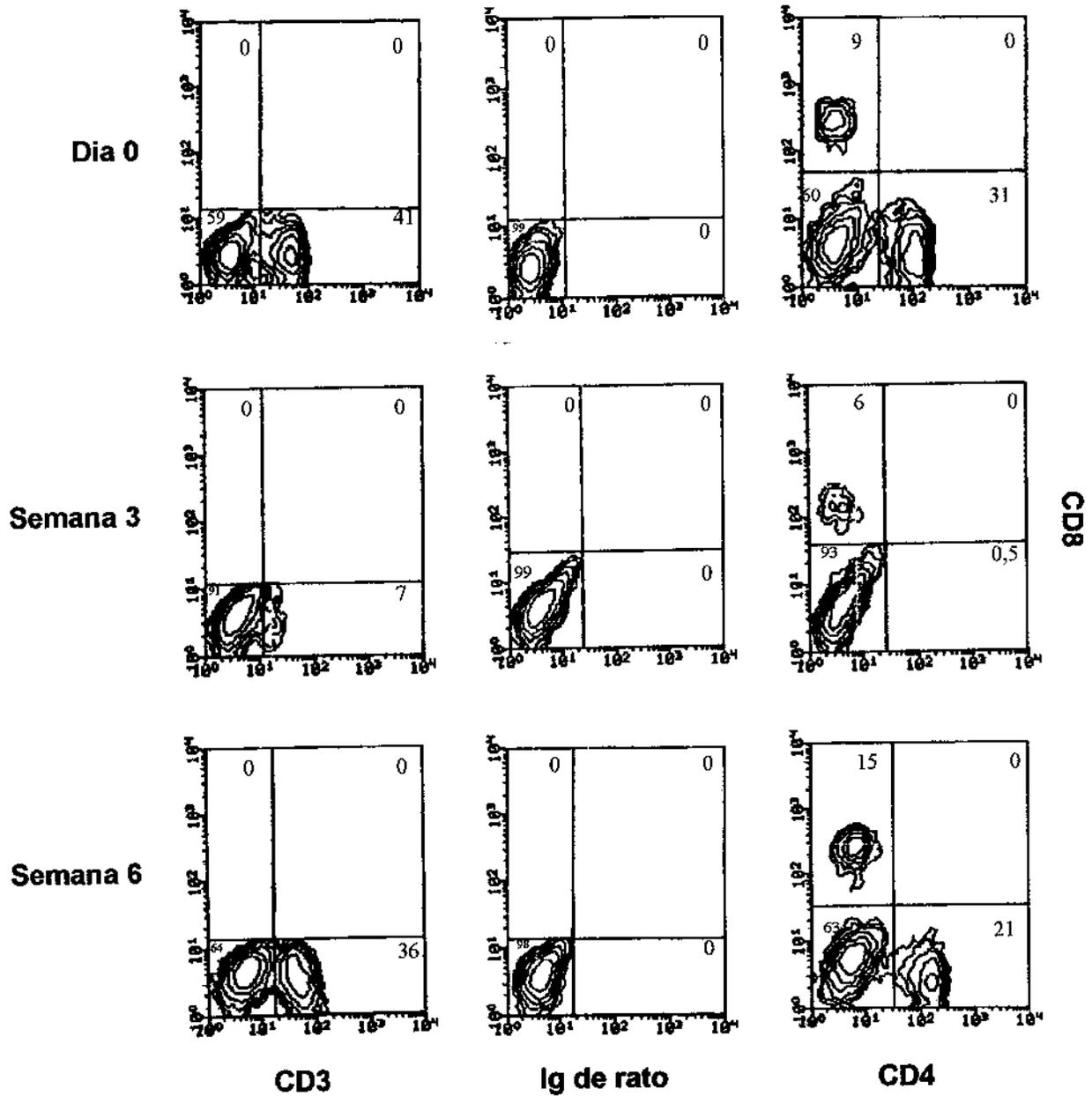


Figura 19: Marcação por imunofluorescência dos esplenócitos T de camundongos NOD, tratados com o AcMo antiCD4 depletante Y191. Os painéis representam "contour plots", obtidos em citometria de fluxo (FACScan), da marcação simples: linfócitos T CD3+ (145 2C11-FITC), Ig de rato (MARK-1-FITC) e em marcação dupla: subpopulações T CD4+ (GK1.5-FITC) e CD8+ (YTS 169-PE). Os números consistem da porcentagem de células marcadas/total de linfócitos da análise individual de camundongos NOD, nos períodos: dia 0 (NOD 1), semana 3 (NOD 2) e semana 6 (NOD 3).

C) Efeito sobre a insulite: aspecto histológico

O efeito relevante do tratamento com o AcMo antiCD4 Y191 foi o de impedir o aparecimento de insulite invasivo-destrutiva (G4), como representado na Figura 20, em comparação aos achados dos animais NOD tratados exclusivamente com ciclofosfamida (CT-CI: Modelo II). Este efeito continuou sendo observado três semanas após o final do tratamento com Y191. Logo após as três injeções iniciais de Y191 (semana 2 do protocolo experimental), constatou-se alteração da característica imagem histológica, descrita na Figura 13, período de progressão de insulite de grau intenso, induzida pela primeira dose de CI, e diminuição da proporção de ilhotas normais.

Observou-se a manutenção da proporção de ilhotas normais/periinsulite (G0 + G1) até o final do acompanhamento dos animais, existindo uma diferença significativa ($p < 0,0014$) entre os animais tratados com Y191 e o grupo CT-CI ($69,6\% \pm 8,8\%$ x $12,9\% \pm 9,7\%$, para $x \pm SEM$, respectivamente), ao término do estudo.

A proporção de ilhotas apresentando insulite invasiva (G2 + G3) não aumentou significativamente, como observado no Modelo II (entre as semanas 1 e 2, após a primeira dose de CI), mantendo-se inalterada após intervenção com Y191. Assim, apesar de persistir insulite invasiva, nos camundongos NOD, tratados pelo AcMo depletante antiCD4 Y191, não houve progressão para o estágio final de destruição das ilhotas de Langerhans.

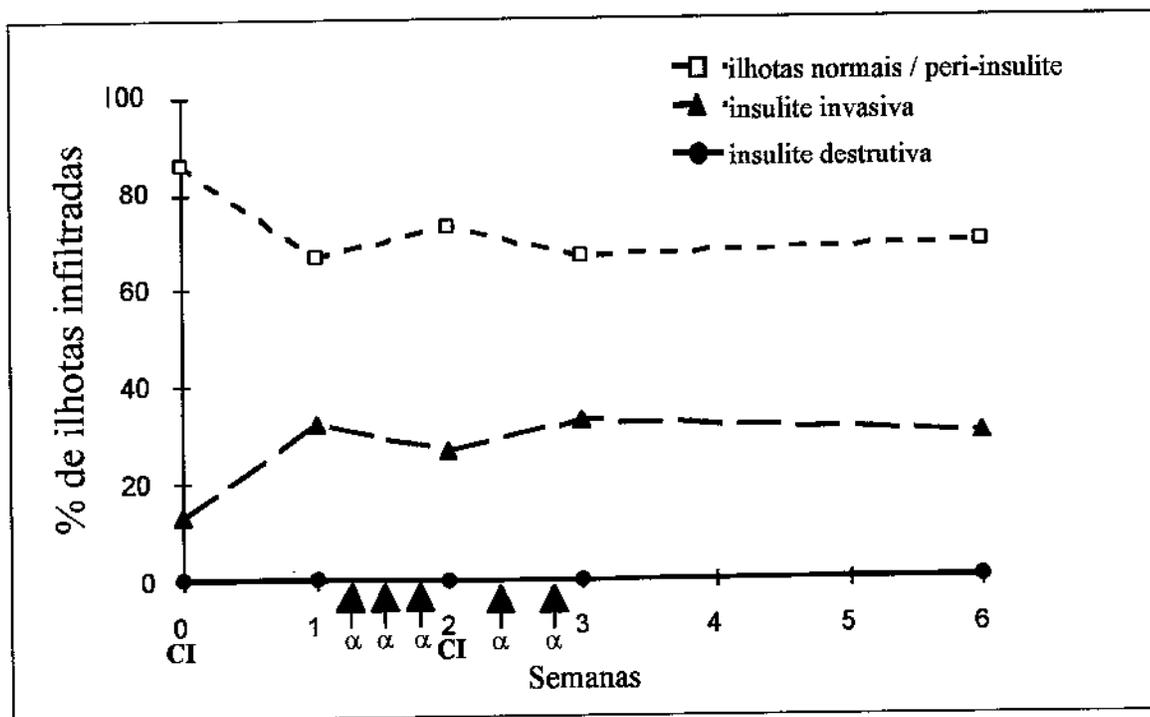


Figura 20: Perfil da insulite em camundongos NOD tratados com o AcMo antiCD4 depletante Y191. Animais NOD injetados com Ciclofosfamida (CI), foram tratados com Y191 i.p. (α) nos dias 10, 11, 12, 16 e 20. Os dados representam a porcentagem média de ilhotas com diferentes graus histológicos de insulite/total de ilhotas contadas/animal, em função do tempo de estudo, em grupos de 6 animais (3 machos e 3 fêmeas)/semana. As cifras correspondentes à porcentagem de ilhotas ($x \pm SEM$)/grau/animal, e o número absoluto médio de ilhotas contadas/animal são:

Tempo (semanas)	Ilhotas normais/periinsulite	Insulite invasiva	Insulite destrutiva	Total de ilhotas/animal
0	85,8 ± 6,2	13,6 ± 5,8	0,6 ± 0,6	49
1	66,9 ± 13,6	32,4 ± 13,2	0,7 ± 0,7	43
2	73,0 ± 1,8	27,0 ± 11,8	0	25
3	67,1 ± 11,8	32,9 ± 11,8	0	30
6	69,6 ± 8,8	30,0 ± 9,0	0,4 ± 0,4	23

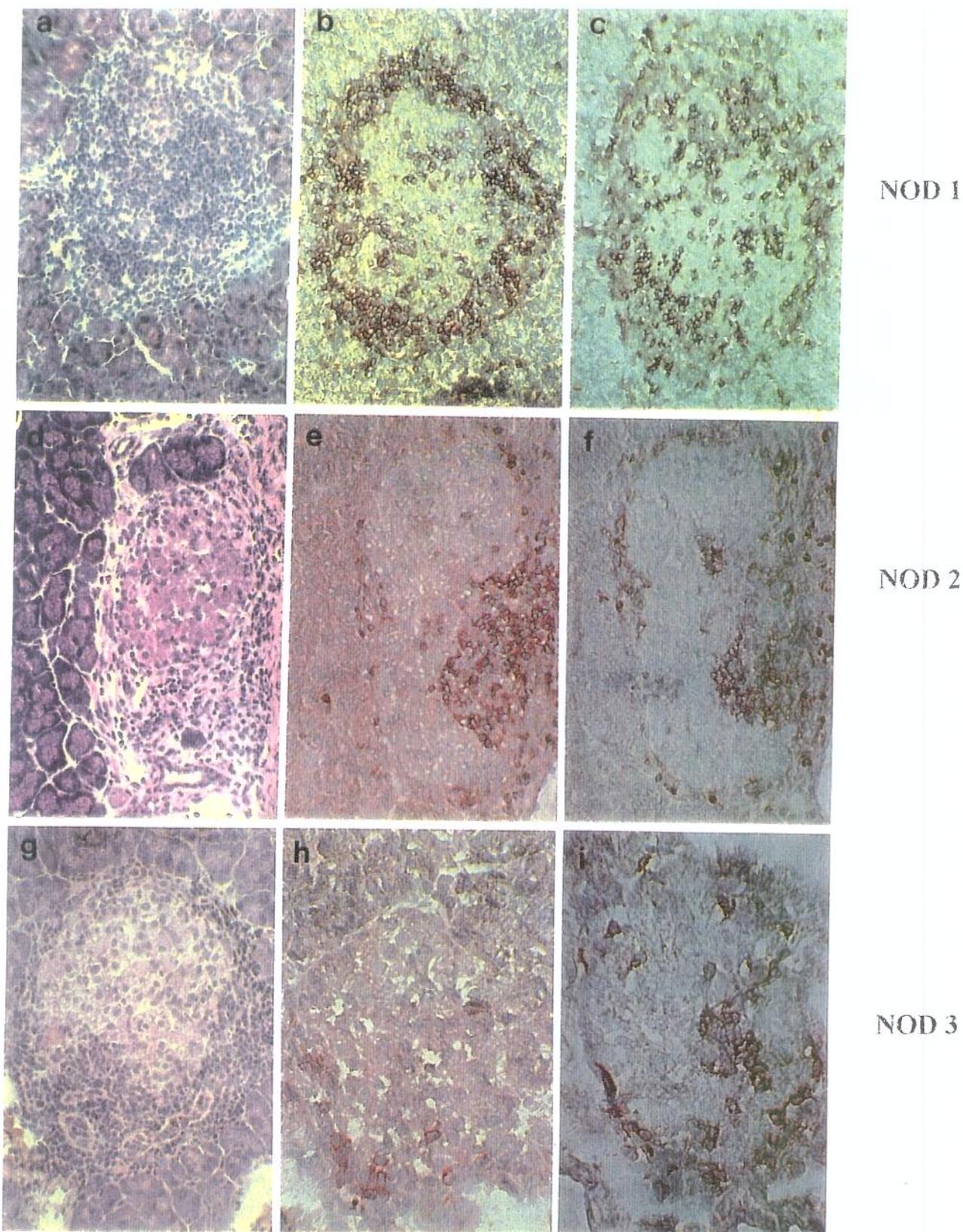
D) Efeito sobre o fenótipo da insulite: imuno-histoquímica

A análise qualitativa, por imuno-histoquímica, das subpopulações linfocitárias T CD4+ e CD8+ presentes no infiltrado insular, confirmou o efeito biológico do AcMo antiCD4 Y191 *in situ*, no pâncreas. Ocorreu nítida depleção de linfócitos T CD4+ nas ilhotas de Langerhans, ainda que mais tardiamente do que a observada em periferia (baço). A Figura 21 representa o aspecto imuno-histoquímico de pâncreas de animais tratados com Y191, em momentos diferentes da terapia.

Após a terceira injeção do AcMo (Figura 21, NOD 2), observou-se que não houve grande depleção imediata de células T CD4+ no infiltrado que afetava as ilhotas, sendo representada uma ilhota com insulite invasiva inicial (G2). Apesar de sua aparente redução numérica, as células T CD4+ apresentavam proporções ainda superiores sobre as T CD8+, nas ilhotas. Ressalta-se que, o infiltrado pancreático que predominava neste momento (semana 2 do protocolo experimental), era do tipo periinsulite (G1) (Figura 20).

Entretanto, ao término do estudo, três semanas após a última injeção de Y191 (Figura 21, NOD 3), a análise imuno-histoquímica mostrou que o infiltrado, também majoritariamente periinsulite, apresentava um número muito reduzido de células T CD4+, sendo constituído, sobretudo, por células T CD8+. Neste momento, observava-se em periferia a reconstituição da subpopulação CD4+, constatando-se, no baço, uma relação CD4:CD8 de 1,5.

A marcação das células do infiltrado insular diretamente com um Ac antiIg de rato sempre se revelou negativa (dados não representados), o que permitiu excluir a presença de células recobertas pelo AcMo Y191, nos pâncreas dos animais estudados.



Histologia **CD4** **CD8**

Figura 21: Subpopulações T CD4⁺ e CD8⁺ em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD tratados com o AcMo antiCD4 depletante Y191. Análises histológica (a, d, g) e imuno-histoquímica das respectivas ilhotas, com os As: anti-CD4 (b, e, h) e anti-CD8 (c, f, i), de diferentes animais. NOD 1: dia 10 após a primeira dose de CI e antes do início do tratamento com Y191, insulite grau 3; NOD 2: 3 dias após as 3 primeiras injeções de Y191, insulite grau 2; NOD 3: 3 semanas após o término do tratamento com Y191, insulite grau 1.

4.2.2. Tratamento com o AcMo depletante antiCD8: Y169

A) Efeito sobre o DMID-CI clínico

Similar ao observado com tratamento com Y191, o AcMo antiCD8 depletante Y169, preveniu o desenvolvimento do DMID-CI clínico, em NOD machos e fêmeas. Os resultados da Figura 22 demonstram o protocolo de administração de Y169, comparável ao descrito anteriormente para Y191. A única diferença consistiu de uma menor dose de AcMo empregada, que foi de 100 µg/injeção (dose total = 0,5 mg/animal) para Y169. A frequência de DMID-CI clínico foi significativamente reduzida, nos animais tratados com Y169: 19% (14/72) em comparação ao grupo CT-CI: 79% (107/136) ($p < 0,001$), ao final do experimento (semana 6).

B) Efeito sobre o fenótipo dos linfócitos T esplênicos

O estudo da cinética de evolução do fenótipo das subpopulações T CD4+ e CD8+ esplênicas confirmou o efeito biológico esperado para o AcMo depletante antiCD8 Y169 *in vivo* (Figura 23). Assim, seguindo a mesma equação realizada para o AcMo Y191 (RESULTADOS, cf 4.2.1 - B), observou-se que Y169 induziu uma depleção média de 94% de células T CD8+ esplênicas em animais machos e fêmeas, um dia após a quinta e última injeção correspondente ao tratamento (semana 3 do protocolo experimental). Apesar de existir reconstituição progressiva da subpopulação T CD8+, após o término da administração de Y169, persistiu, em baço dos animais NOD tratados, uma depleção média de 47% das mesmas, ao término do estudo (três semanas após a última injeção do AcMo). A repopulação das células T CD8+, após depleção com Y169 foi, pois, mais lenta que a observada com as células T CD4+, após depleção com Y191, no final do experimento (53% x 79%, respectivamente). A Figura 24 representa imagens obtidas em citometria de fluxo da marcação por imunofluorescência dos esplenócitos T CD4+ e CD8+, em camundongos NOD, tratados com Y169. Não foi observado recobrimento linfocitário com Y169 (marcação com Ac antiIg de rato) durante o período estudado.

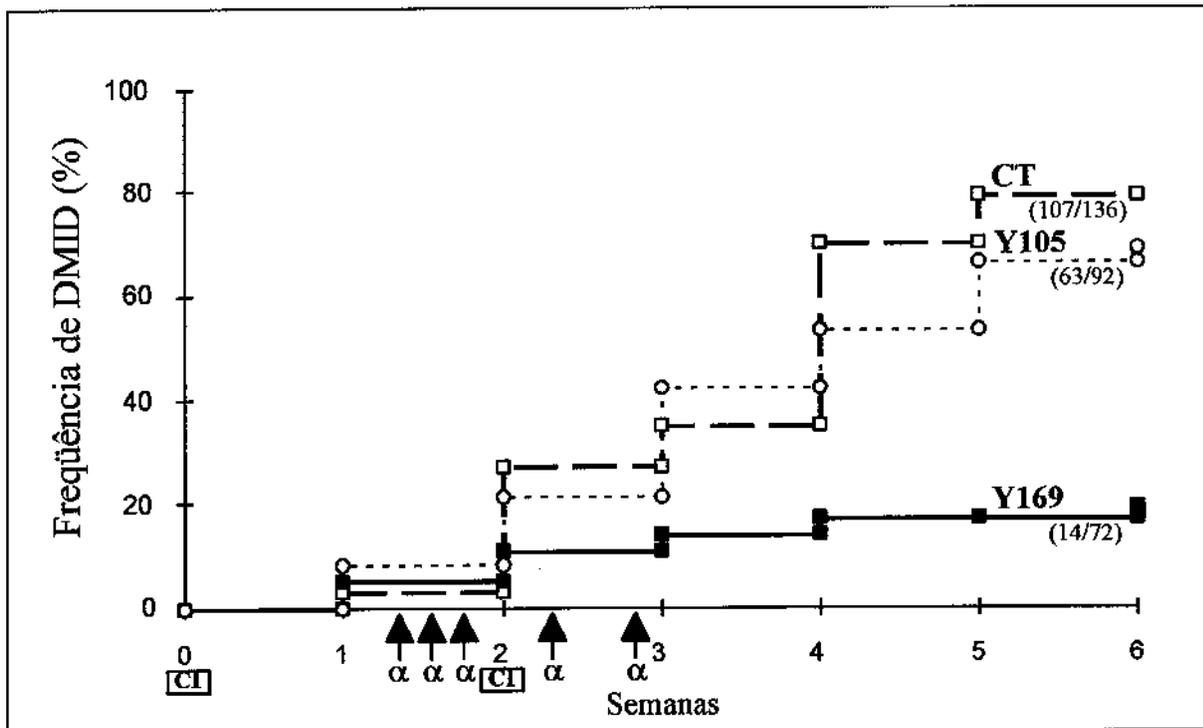


Figura 22: Tratamento do DMID-CI clínico do camundongo NOD com AcMo antiCD8 depletante Y169. Animais NOD machos e fêmeas, de 8 semanas de idade, foram injetados com ciclofosfamida (CI) (200 mg/kg, i.p.), no intervalo de catorze dias. 72 animais (36 fêmeas e 36 machos) foram tratados com Y169 (■) (100 µg/dose, i.p.) (α) nos dias 10, 11, 12, 16 e 20. Grupos controles: CT-CI (□): animais que receberam unicamente CI; AcMo controle Y105 (○) (100 µg/dose). Uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o grupo tratado com Y169 e o grupo controle ($p < 0,001$).

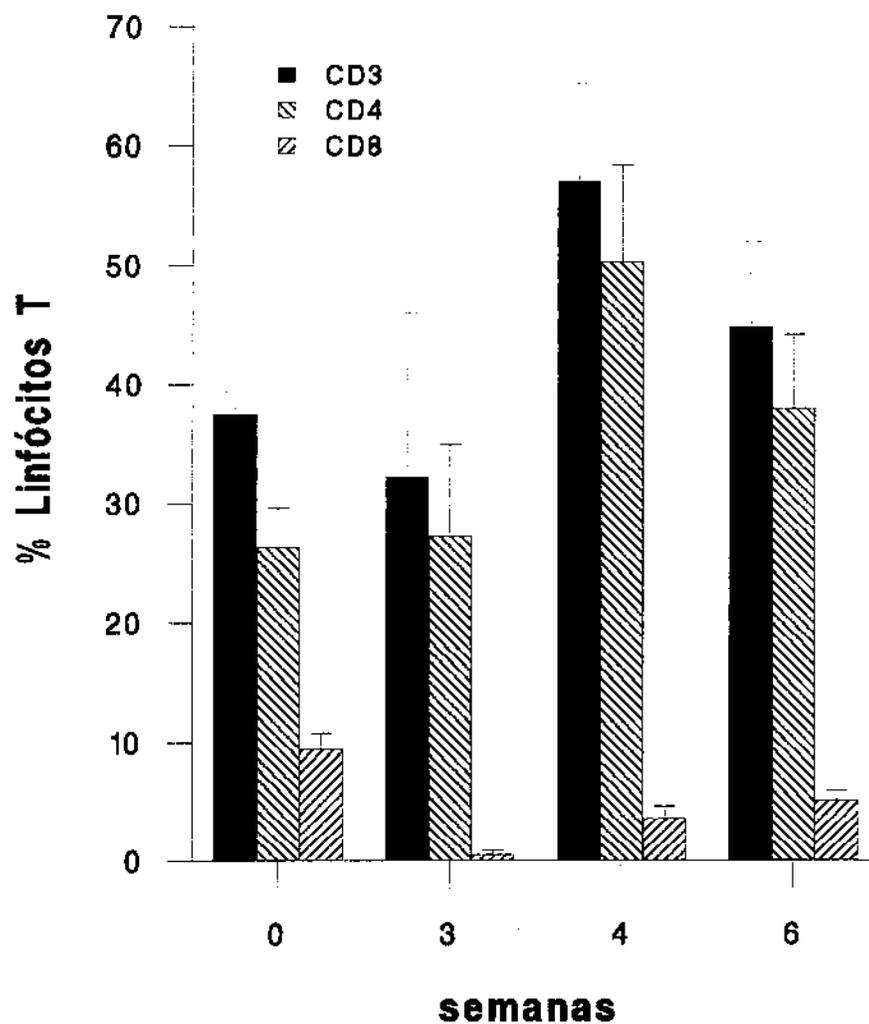


Figura 23: Efeito do tratamento com o AcMo antiCD8 depletante Y169 sobre o fenótipo das subpopulações T esplênicas CD4+ e CD8+. Análise cinética, em citometria de fluxo, do número relativo de linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ ($x \pm SD$). Baços de 4-6 animais (mínimo de 2 fêmeas e 2 machos), foram analisados/semana.

	% CD3+	% CD4+	% CD8+	CD4/CD8	% depl. CD8
Dia 0	37.5 ± 1.9	26.3 ± 3.3	9.5 ± 1.3	2.8	-
Semana 3	32.2 ± 13.8	27.2 ± 7.8	0.5 ± 0.4	50.4	93.8
Semana 4	57.0 ± 8.2	50.3 ± 8.1	3.7 ± 1.0	13.4	75.2
Semana 6	44.8 ± 7.1	38.0 ± 6.2	5.2 ± 0.8	7.3	47.0

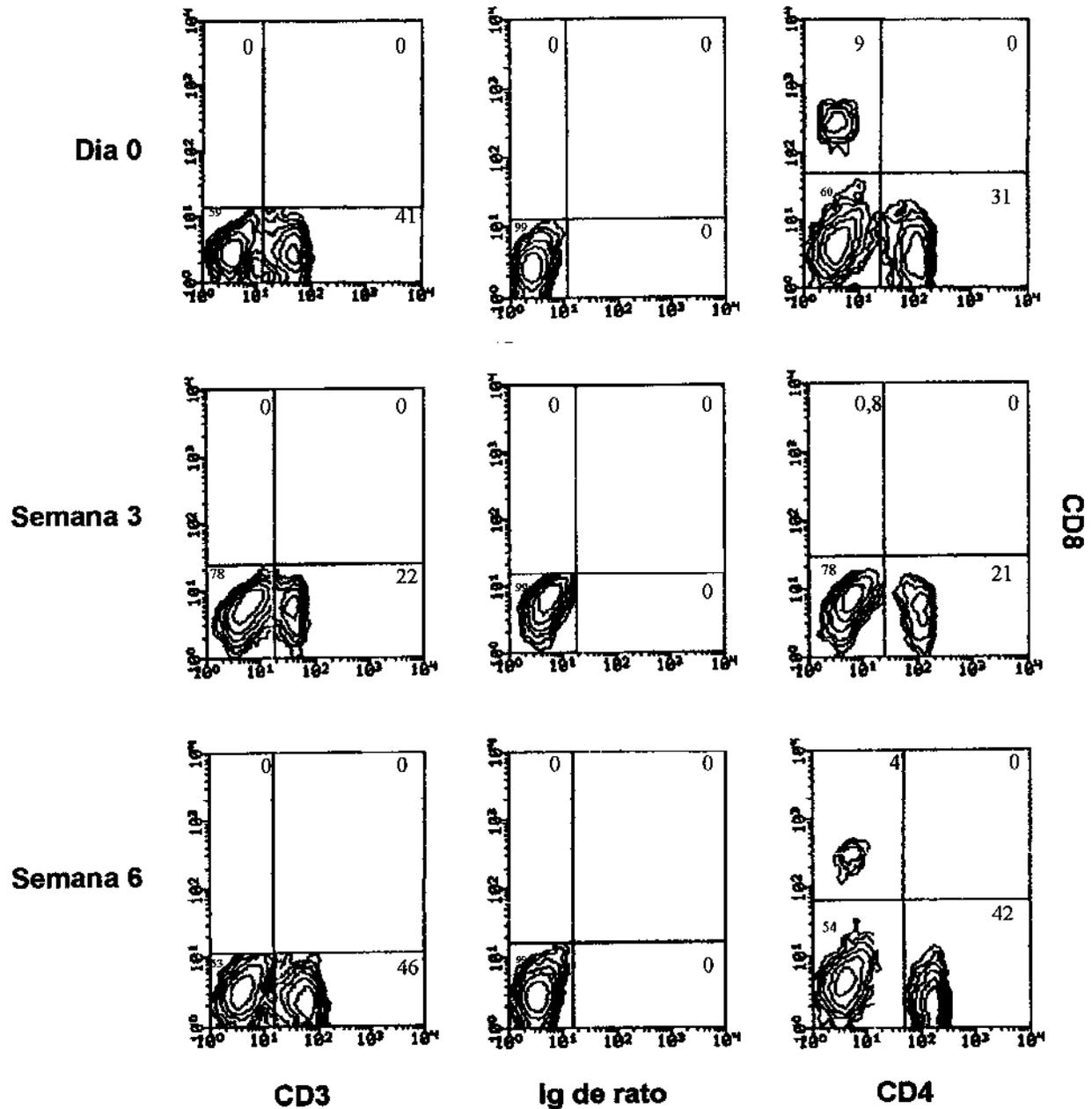


Figura 24: Marcação por imunofluorescência dos esplenócitos T de camundongos NOD, tratados com o AcMo antiCD8 depletante Y169. Os painéis representam "contour plots", obtidos em citometria de fluxo (FACScan), da marcação simples: linfócitos T CD3+ (145 2C11-FITC), Ig de rato (MARK-1-FITC) e em marcação dupla: subpopulações T CD4+ (GK1.5-FITC) e CD8+ (YTS 169-PE). Os números consistem da porcentagem de células marcadas/total de linfócitos da análise individual de camundongos NOD, nos períodos: dia 0, semana 3 e semana 6.

C) Efeito sobre a insulite: aspecto histológico

A terapia com Y169, contrastando com o que ocorreu com Y191, não modificou substancialmente o perfil de insulite, induzido por CI, nos animais NOD tratados, como representado na [Figura 25](#). Observou-se a mesma imagem, denominada em espelho, conseqüente ao aumento de insulite de grau avançado e redução de ilhotas normais, descrito para o Modelo II ([Figura 13](#)), entre a primeira e segunda semanas após a primeira dose de CI. A única diferença consistiu no deslocamento destas alterações histológicas, no tempo, postergadas em uma semana, nos animais tratados com Y169.

Assim, logo após o início do tratamento com Y169 (entre as semanas 1 e 2 do protocolo experimental), houve uma marcada preservação de ilhotas normais ou com periinsulite e bloqueio da progressão para os estádios de intensa infiltração insular. Este efeito desapareceu durante o final do protocolo terapêutico, visto que, ocorreu, entre a segunda e terceira semanas do estudo, uma redução significativa da proporção de ilhotas normais/periinsulite ($p < 0,02$) e, paralelamente, um aumento significativo da proporção de ilhotas com insulite invasiva ($p < 0,001$). A proporção de ilhotas com insulite destrutiva evoluiu, de forma progressiva, até o término do acompanhamento dos animais.

D) Efeito sobre o fenótipo da insulite: imuno-histoquímica

A análise qualitativa imuno-histoquímica de subpopulações T CD4+ e CD8+, em ilhotas de Langerhans de pâncreas de animais NOD machos e fêmeas, tratados com Y169 demonstrou, *in situ*, o efeito biológico deste AcMo. Observou-se importante depleção de células T CD8+. Mas, similar aos achados com Y191, este efeito ocorreu, mais tardiamente, no pâncreas, que em periferia (baço). A [Figura 26](#) representa as subpopulações T CD4+ e CD8+, encontradas nas ilhotas de animais tratados com Y169, em momentos diferentes da terapia. Após a terceira injeção de Y169, observou-se uma moderada depleção de células T CD8+ no nível da insulite, sendo representada na [Figura 26](#) (NOD 3) uma ilhota com insulite invasiva (G3). Este estágio foi caracterizado, em nossos experimentos sobre o grupo CT-CI (análise imuno-histoquímica qualitativa), por proporções similares de células T CD4+ e CD8+.

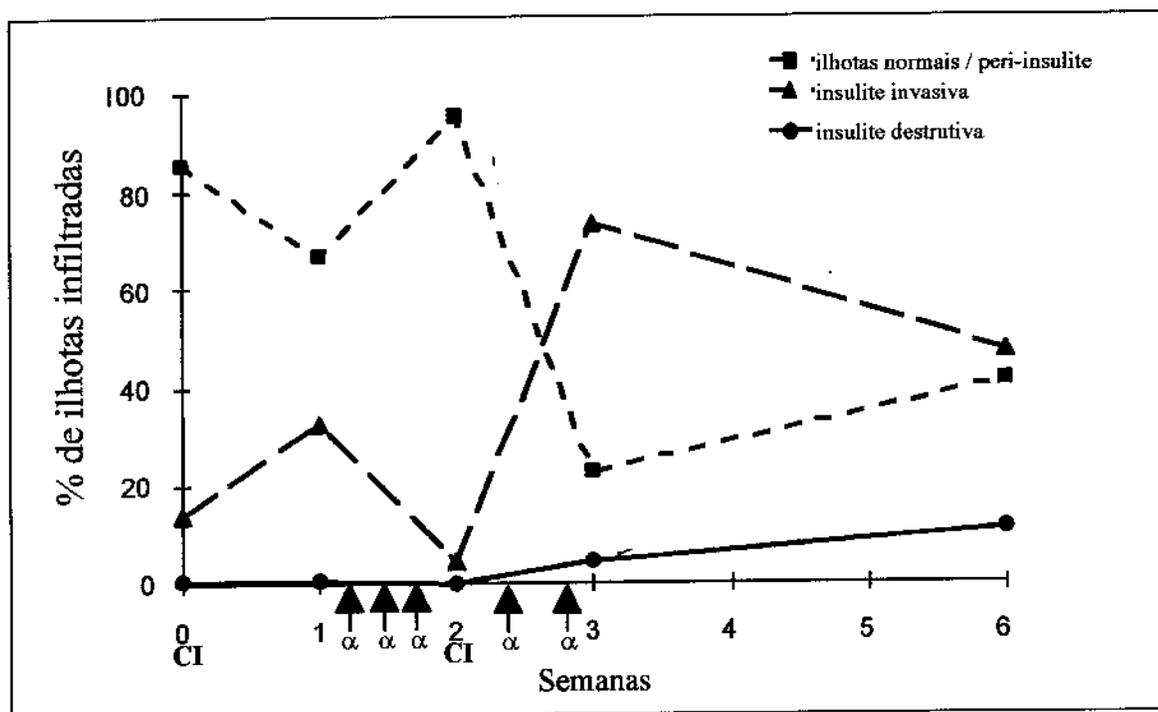


Figura 25: Perfil da insulite em camundongos NOD tratados com o AcMo antiCD8 depletante Y169. Animais NOD injetados com Ciclofosfamida (CI), foram tratados com Y169 i.p. (α) nos dias 10, 11, 12, 16 e 20. Os dados representam a porcentagem média de ilhotas com diferentes graus histológicos de insulite/total de ilhotas contadas/animal, em função do tempo de estudo, em grupos de 6 animais (3 machos e 3 fêmeas)/semana. As cifras correspondentes à porcentagem de ilhotas ($x \pm SEM$)/grau/animal, e o número absoluto médio de ilhotas contadas/animal são:

Tempo (semanas)	Ilhotas normais/periinsulite	Insulite invasiva	Insulite destrutiva	Total de ilhotas/animal
0	85,8 \pm 6,2	13,6 \pm 5,8	0,6 \pm 0,6	49
1	66,9 \pm 13,6	32,4 \pm 13,2	0,7 \pm 0,7	43
2	95,8 \pm 2,8	4,2 \pm 2,8	0	27
3	22,6 \pm 13,1	67,2 \pm 12,1	4,2 \pm 1,9	39
6	41,2 \pm 11,7	47,6 \pm 9,0	11,2 \pm 4,1	26

Contudo, ao término do estudo, três semanas após a última injeção de Y169, os linfócitos que infiltravam as ilhotas (sobretudo insulite invasivo/destrutiva) consistiam em uma proporção muito reduzida de células T CD8+ (Figura 26, NOD 3), sendo predominantemente células T CD4+. Neste momento (semana 6 do protocolo experimental), observava-se, em periferia (baço), reconstituição parcial de células T CD8+ (CD4:CD8 = 7,3).

Não se constataram linfócitos recobertos por Y169 (marcação com Ac antiIg de rato) no nível da insulite (dados não representados), de forma similar ao observado no tratamento com Y191.

4.2.3. Aspectos gerais do tratamento com o AcMo controle ANTICD8 Y105.

O AcMo antiCD8 Y105, descrito como não depletante *in vivo* (QIN et al, 1989), apresentou, porém, em nossos experimentos, um duplo efeito biológico (Figura 27). Utilizado na dose de 100 µg/injeção (dose total = 0,5 mg/animal), observou-se em periferia, por imunofluorescência, logo após o término do protocolo terapêutico (semana 3), o efeito de não depleção esperado: um recobrimento das células T CD8+, detectado com Ac antiIg de rato. Entretanto, na semana 4 do estudo, encontrou-se uma depleção média de células T CD8+ de 60%, que persistiu em nível médio de 46%, ao final do período experimental (semana 6). A ação de Y105, no desenvolvimento do DMID-CI clínico, foi irrelevante (Figura 17), visto que 66% (63/92) dos animais estavam diabéticos ao término do estudo, valor similar ao encontrado no grupo que recebeu CI exclusivamente (79%: 107/136).

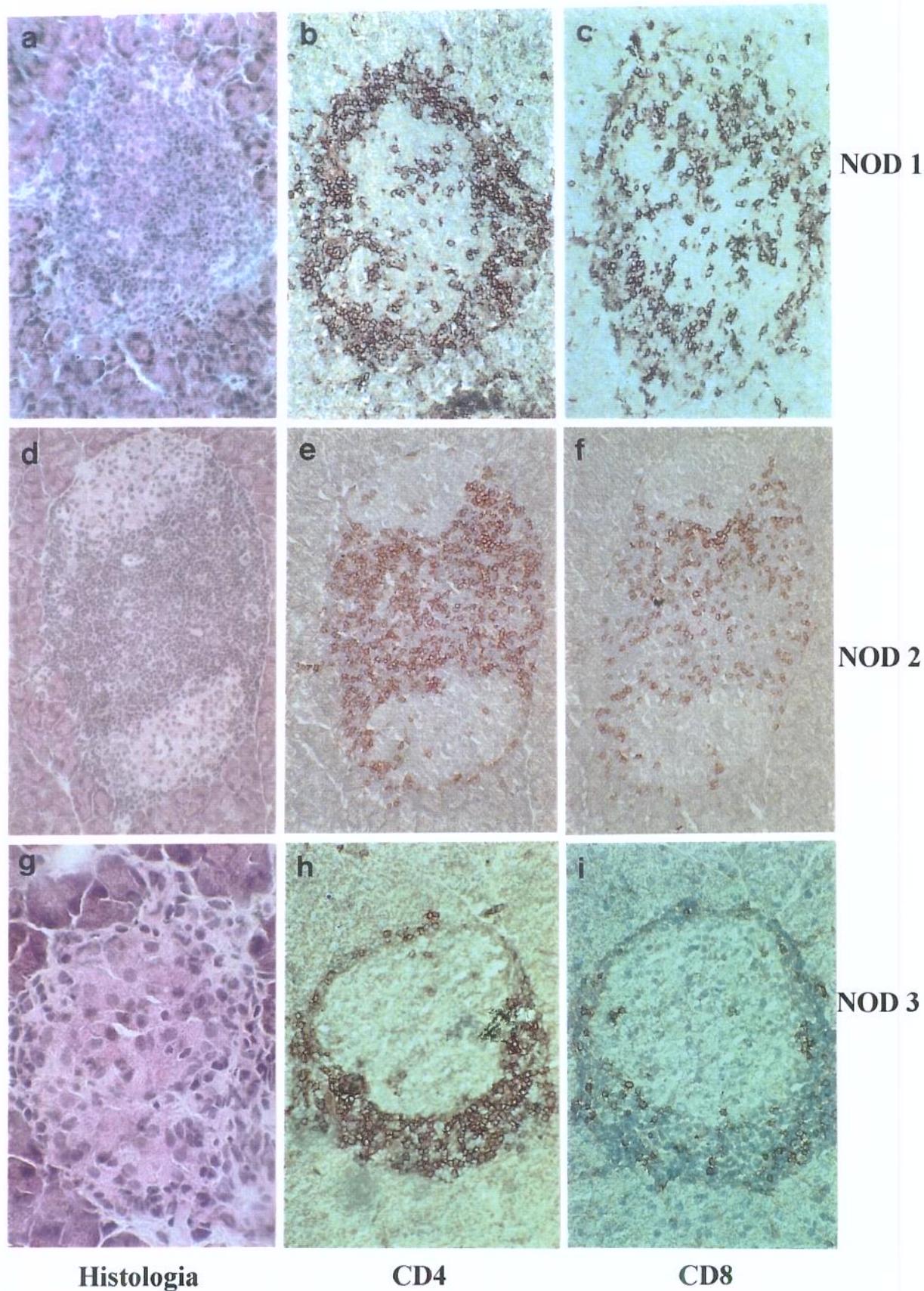


Figura 26: Subpopulações T CD4⁺ e CD8⁺ em ilhotas de camundongos NOD tratados com o AcMo antiCD8 depletante Y169. Análises histológica (a, d, g) e imunohistoquímica das respectivas ilhotas com os Acs: antiCD4 (b, e, h) e antiCD8 (c, f, i), de diferentes animais. NOD 1: dia 10 após a primeira dose de CI e antes do início do tratamento com Y169, insulite grau 3; NOD 2: três dias após as três primeiras injeções de Y169, insulite grau 3; NOD 3: três semanas após o término do tratamento com Y169, insulite grau 2.

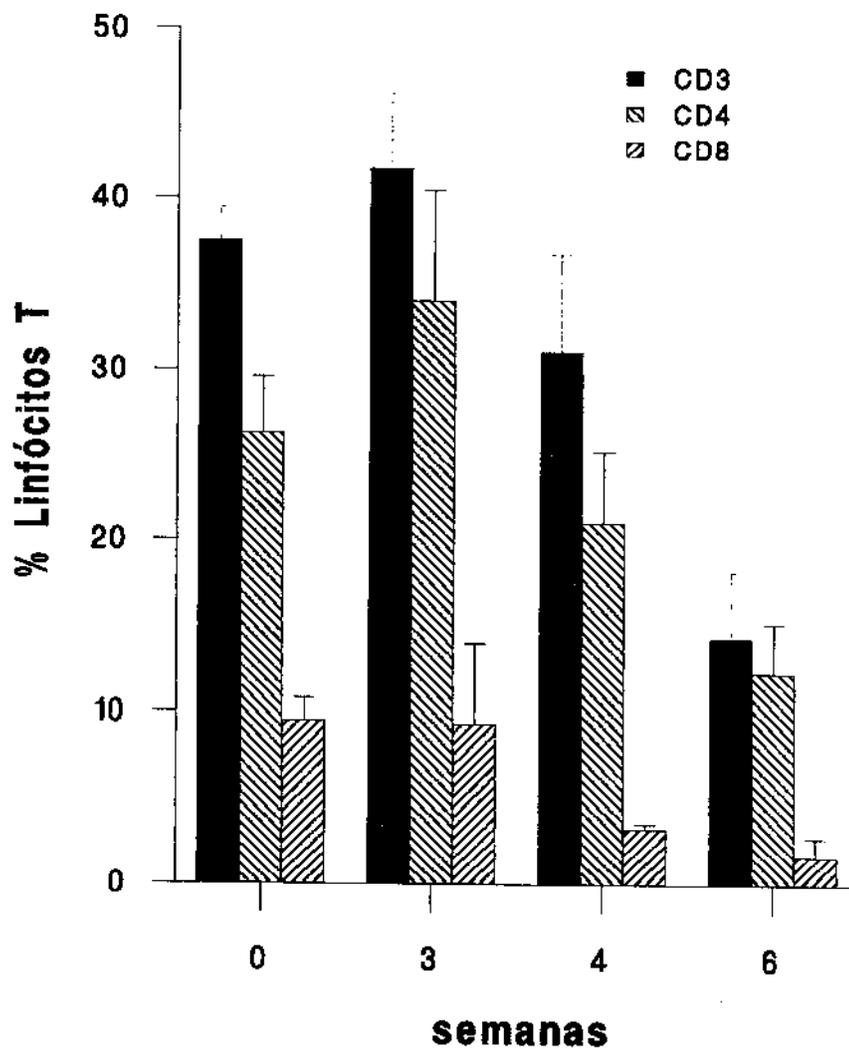


Figura 27: Efeito do tratamento com o AcMo antiCD8 Y105 sobre o fenótipo das subpopulações T esplênicas CD4+ e CD8+. Análise cinética, em citometria de fluxo, do número relativo de linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ ($x \pm SD$). Baços de 4 animais (2 fêmeas e 2 machos), foram analisados/semana.

	% CD3+	% CD4+	% CD8+	CD4/CD8	% depl.CD8+
Dia 0	37,5 ± 1,9	26,3 ± 3,3	9,5 ± 1,3	2,8	-
Semana 3	41,7 ± 4,5	34,0 ± 6,4	9,3 ± 4,7	3,7	-
Semana 4	31,0 ± 5,7	21,0 ± 4,2	3,3 ± 0,3	6,4	59,7
Semana 6	14,3 ± 3,8	12,3 ± 2,9	1,7 ± 1,1	7,2	45,6



5. Discussão

5.1. CARACTERÍSTICAS DO DIABETES ACELERADO PELA CICLOFOSFAMIDA (DMID-CI)

O modelo de diabetes acelerado pela ciclofosfamida (DMID-CI) no camundongo NOD foi utilizado para estudar o efeito de anticorpos monoclonais (AcMos), específicos de células T murinas CD4⁺ e CD8⁺, no tratamento da doença. Avaliou-se, inicialmente, se o modelo DMID-CI adaptava-se a pré-requisitos oportunos à elaboração de um protocolo de imuno-intervenção do diabetes auto-imune em estágio avançado de insulite.

Foi reproduzido e adaptado, à nossas condições, o modelo original de DMID-CI descrito por HARADA & MAKINO (1984) em camudongos NOD (Clea Japan Inc., Tóquio), geradores das matrizes da colônia NOD estabelecida no laboratório INSERM U-25, Paris, utilizada neste estudo. Estas colônias NOD caracterizam-se por alta frequência de DMID clínico espontâneo em fêmeas, sendo a do laboratório INSERM U-25 (YASUNAMI & BACH, 1988) de 55% na 25ª semana de vida e < 28% na 14ª semana, idade correspondente aos animais mais velhos de nossos experimentos.

O modelo DMID-CI é um instrumento experimental de interesse, pois reproduz o diabetes auto-imune espontâneo do camundongo NOD, reduzindo o período entre a progressão da insulite e o desenvolvimento do diabetes clínico. Este conceito está baseado nas observações de um grupo de pesquisadores (CHARLTON, BACELJ, MANDEL, 1988; CHARLTON & MANDEL, 1988; CHARLTON et al., 1989; ZHANG, GEORGIU, MANDEL, 1993), que analisaram a particular linhagem NOD/Wehi (derivada de Kyoto, Japão) e padronizaram um protocolo para o modelo DMID-CI, que compreende uma injeção única de 300 mg/kg de CI a animais de catorze semanas de idade. Camundongos NOD/Wehi são similares às demais colônias NOD quanto à incidência de insulite (início: 7ª semana de vida), mas caracterizam-se por baixa frequência de DMID clínico espontâneo: < 10% das fêmeas e < 1% dos machos com vinte e oito semanas de vida.

Para elaborar uma janela terapêutica, adequada para a intervenção em insulite avançada, no modelo DMID-CI do camundongo NOD, estratégia pouco documentada na literatura, foi realizada uma análise do DMID após uma e duas injeções de CI, denominados Modelos I e II, respectivamente. Foi avaliado o efeito das doses de CI no desenvolvimento do diabetes clínico e, principalmente, na cinética de evolução da insulite do ponto de vista histológico, ainda não caracterizada na linhagem NOD utilizada. Paralelamente, foi monitorizado o fenótipo de subpopulações linfocitárias periféricas (baço), sobretudo T, no modelo DMID-CI, para posterior análise do efeito causado pela administração de AcMos antiCD4 e antiCD8.

5.1.1. Perfil e evolução do DMID-CI clínico

Os resultados confirmaram que a administração de CI a animais NOD, com oito semanas de idade, acelera o desenvolvimento do DMID clínico em fêmeas e o induz em machos, em comparação à evolução espontânea da doença. A frequência máxima de DMID clínico, obtida quatro semanas após a administração de uma dose única de CI (Modelo I), aproximadamente 36% em ambos os sexos, foi estável, não sendo observadas remissões, como referido previamente no único estudo sobre este modelo na linhagem NOD utilizada (YASUNAMI & BACH, 1988). O efeito da CI na expressão do DMID clínico foi potencializado com duas doses de CI (Modelo II), obtendo-se uma frequência máxima de aproximadamente 80% de animais diabéticos de ambos os sexos, quatro semanas após a última injeção da droga. Estes valores foram similares aos descritos originalmente por HARADA & MAKINO (1984), e por outros autores que utilizaram este modelo de DMID-CI, em camundongos NOD da colônia INSERM U-25 (YASUNAMI & BACH, 1988; SEMPÉ et al., 1991; DEBRAY-SACHS et al., 1991; CHATENAUD et al., 1994).

5.1.2. Perfil e evolução do fenótipo dos linfócitos esplênicos

Observou-se, por análise semanal, em citometria de fluxo, do número relativo das populações linfocitárias B e T, que a CI afetou predominantemente os linfócitos B portadores de Ig de superfície, acarretando uma marcada e rápida depleção celular, similar em machos e fêmeas. Esta depleção de células B foi dose-dependente, atingindo níveis máximos relativos de 51% e 69%, uma semana após a primeira (Modelos I e II) ou segunda injeção de CI (Modelo II), respectivamente. Observou-se reconstituição progressiva do "pool" de células B esplênicas, sendo, contudo, ainda parcial (71%) ao término dos experimentos mais longos, quatro semanas após a segunda injeção de CI (Modelo II).

Detectou-se, apenas na segunda semana após a primeira dose de CI, uma depleção em torno de 22% do número relativo de linfócitos T CD3+ TCR $\alpha\beta$ + esplênicos. A reconstituição completa do "pool" de células T ocorreu, porém, entre a primeira e segunda semanas subsequentes. A análise fenotípica das subpopulações T esplênicas (Modelo II) demonstrou não haver distúrbios quantitativos particulares de células T CD4+ e CD8+, tanto em machos como em fêmeas NOD tratados com CI, exceto no período da observada redução de células T. Neste momento, a relação CD4:CD8, que se manteve dentro dos limites normais durante o resto do estudo (valor médio CD4:CD8 antes da CI = 2,8), apresentou-se aumentada (3,8), por diminuição do número relativo de células T CD8+.

Estes dados contribuem para o estudo da cinética de evolução quantitativa de populações linfocitárias B e T no modelo DMID-CI, na linhagem NOD utilizada. CHARLTON et al. (1989) demonstrou marcada depleção linfocitária B e T em baço e gânglios, após CI, na particular linhagem NOD/Wehi. Os autores relataram níveis médios de depleção celular superiores aos nossos achados, detectados, porém, quatro dias após a administração de CI. A reconstituição destas células, estudada dezesseis dias após CI,

foi ainda incompleta, havendo recuperação preferencial de células T, analisada por aspecto histológico de baço e gânglios.

Os resultados deste trabalho e os de CHARLTON et al. (1989) são compatíveis com os descritos mecanismos de ação da CI (BACH & STROM, 1985). Altas doses de CI estão associadas com a depressão numérica, por lise, de células B e T. Estudos em porcos da Índia e camundongos sugeriram, entretanto, que uma injeção de CI, na dose de 300 mg/kg, induziria uma depleção seletiva transitória de células B. Esta depleção B foi verificada, por análise histológica, no nível dos centros germinativos em linfonodos e da polpa branca em baço. Verificou-se que, a reconstituição celular ocorre entre dez a catorze dias após a administração de CI em baço, linfonodos e medula óssea. O baço caracterizou-se por excesso do número de linfócitos, logo após a completa recuperação celular. Em nossos ensaios, a recuperação de células B esplênicas foi lenta, compatível com um grau diferencial de ação da CI sobre o compartimento B.

CHARLTON & MANDEL (1988); ZHANG, GEORGIU, MANDEL (1993) descreveram o efeito da CI sobre a cinética de esplenócitos T em camundongos NOD/Wehi, durante catorze dias após a administração da droga. Os autores observaram uma depleção numérica de células T CD4⁺ e CD8⁺ quatro dias após a injeção de 300 mg/kg de CI. Esta depleção foi, porém, relativamente maior de células T CD4⁺ que CD8⁺, e transitória, havendo recuperação completa em uma semana. Os autores sugeriram que, as células T CD4⁺ seriam mais suscetíveis à ação citotóxica da CI que as células T CD8⁺.

TAKI et al. (1991) citou uma análise pontual de esplenócitos T, utilizando o modelo DMID-CI original, em camundongos NOD/Shi/Kbe (Shiga, Japão), colônia de alta frequência de diabetes clínico espontâneo. Os autores descreveram uma acentuada depleção relativa de linfócitos T (Thy1.2⁺) esplênicos, avaliada em momento único: duas semanas após a segunda injeção de CI. Ao mesmo tempo, as proporções relativas de células T CD4⁺ (L3T4⁺) e CD8⁺ (Lyt2⁺) descritas, conservaram-se dentro da normalidade. Curiosamente, a análise da cinética destas subpopulações T, em sangue periférico, até duas semanas após a

segunda dose de CI, não revelou depleção linfocitária e a relação CD4:CD8 manteve-se inalterada durante todo o estudo.

KAY, CAMPBELL, HARRISON (1991) realizaram uma análise fenotípica comparativa de linfócitos T provenientes de pâncreas, baço, gânglios peripancreáticos e sangue periférico, nos catorze dias que sucederam a injeção de CI, em fêmeas NOD/Wehi e NOD-Lt (NOD-Leiter, linhagem com alta frequência de diabetes clínico espontâneo). A relação CD4:CD8 manteve-se inalterada em baço e exibiu um aumento (duplicação) não explicado em sangue periférico, após CI. Os autores encontraram, contudo, uma diminuição da relação CD4:CD8 em linfócitos T pancreáticos, ocasionada por aumento relativo de células CD8+, nos animais com DMID clínico, não refletida em baço ou sangue periférico.

Poucos dados estão disponíveis na literatura sobre o efeito da CI em subpopulações T. Estudos em pacientes com esclerose múltipla ou síndrome nefrótica, nos quais realizou-se tratamento longo com CI, relataram uma depressão seletiva de células T OKT4+ e não de células T OKT8+ (BACH & STROM, 1985). Existe, atualmente, extensa evidência experimental de associação da CI como imunossupressora de respostas celulares. Curiosamente, os mecanismos intrínsecos do distúrbio da imunorregulação, provocado pela CI, não estão esclarecidos. No que concerne às subpopulações T, não foi descrita uma análise detalhada deste desequilíbrio CD4:CD8, mesmo em caráter numérico, após CI. Os dados são raros e correspondem a diferentes protocolos de administração e dose de CI, incluindo o modelo DMID-CI do camundongo NOD.

A maioria das observações citadas sobre o modelo DMID-CI, assim como as deste estudo, não objetivaram o estudo do efeito da CI sobre o fenótipo linfocitário, mas a utilização do modelo em protocolos de intervenção com AcMos que afetam os linfócitos T. Neste trabalho, a análise do fenótipo linfocitário T, após CI e previamente à administração dos AcMos, foi fundamental para a avaliação do efeito biológico dos mesmos. Algumas considerações, porém, podem ser efetuadas. Não existe um desequilíbrio numérico relevante das duas principais subpopulações T, CD4+ e CD8+, em baço, no modelo

DMID-CI na linhagem de camundongos NOD estudada. Talvez não tenha sido possível detectá-lo em nossos ensaios, por motivos técnicos, devido à cinética semanal escolhida para análise fenotípica, e não diária, como realizado por CHARLTON & MANDEL (1988). Mas, se tal desequilíbrio ocorre, trata-se de um fenômeno transitório e rapidamente reversível.

Outro fator a esclarecer é a relevância das alterações fenotípicas T extrapancreáticas na indução do DMID-CI. CHARLTON et al. (1989) sugere que, o DMID-CI em NOD/Wehi seja causado, principalmente, por remoção de atividade T supressora, baseando-se, também, em estudos funcionais (a transferência de células mononucleares de NOD não diabéticos previne o DMID-CI clínico). A depleção de esplenócitos T, causada pela droga, seria seguida de recuperação de células T executoras, possivelmente CD4+, de forma rápida, a partir do quinto dia após a administração de CI. Este período de recuperação estaria associado com o desenvolvimento de insulite invasiva e DMID clínico nos animais tratados. Mas os autores observaram, assim como KAY, CAMPBELL, HARRISON (1991), uma diminuição *in situ*, no pâncreas, de células infiltrantes, concomitantemente à constatada na periferia. A insulite reestabelecer-se-ia, sete dias após a injeção de CI, com predomínio de células T CD4+, nos dois estudos.

Estas relevantes alterações pancreáticas não seriam, porém, traduzidas em periferia, de forma clara. Vários são os fatores que podem contribuir para tal achado, além de variações inerentes aos ensaios utilizados. Não está documentada, por exemplo, uma análise longitudinal detalhada do fenótipo T em órgãos linfóides profundos e sangue periférico, comparativamente em animais diabéticos e não diabéticos, após CI. KAY, CAMPBELL, HARRISON (1991) realizaram esta distinção somente na análise de linfócitos T pancreáticos. Por outro lado, ainda não foi esclarecido quais células, denominadas supressivas, estariam afetadas pela CI, neste modelo. A simples análise fenotípica das maiores subpopulações T CD4+ e CD8+, mesmo em pâncreas, é insuficiente para caracterizá-las. A busca de marcadores fenotípicos murinos de atividade supressora é de fundamental interesse para complementar o estudo da imunopatogênese do DMID-CI do camundongo NOD.

5.1.3. Perfil e evolução da insulite: aspectos histológicos

Aspectos histológicos da insulite em camundongos NOD machos e fêmeas, tratados com uma (Modelo I) ou duas injeções de CI (Modelo II), foram analisados detalhadamente. Os resultados demonstraram que, a insulite do modelo DMID-CI é, no conjunto das características: morfologia (histologia convencional com hematoxilina-eosina) e cinética de evolução, similar à observada no curso do diabetes espontâneo de fêmeas desta linhagem NOD. A única diferença referiu-se à idade de aparecimento dos estádios avançados de infiltração insular, antecipada pela injeção de CI, a animais NOD de oito semanas de vida, em ambos os sexos.

Observou-se uma interessante característica histológica de evolução da insulite, tanto no curso do DMID espontâneo de fêmeas NOD, como do DMID-CI em machos e fêmeas NOD. O infiltrado insular invasivo afetou, de maneira homogênea, o conjunto das ilhotas de Langerhans pancreáticas. Retomando o sistema adotado para estadiamento da insulite (MATERIAIS E MÉTODOS, cf 3.5), foi evidenciado que a diminuição proporcional progressiva, em função do tempo, do número de ilhotas normais ou levemente acometidas (periinsulite) ocorreu de forma concomitante ao aumento do número de ilhotas com marcado grau de infiltração (insulite invasivo-destrutiva). Esta observação sugeriu a existência de uma janela precisa no tempo, onde o processo auto-imune *in situ* no pâncreas, considerando-se a insulite como marcador, progrediu de tal forma a afetar, uniformemente, a quase totalidade das ilhotas. Este momento no tempo situou-se, no modelo DMID-CI, entre o 7º e o 14º dias após a primeira injeção de CI (RESULTADOS, Figuras 12 e 13).

Este estudo apresentou uma evolução histológica extensa do DMID-CI, em linhagem NOD de alta frequência de diabetes clínico. Estes resultados demonstraram similaridades entre os animais que receberam uma ou duas injeções de CI. Este fato pode parecer paradoxal, perante o aumento significativo da frequência do DMID clínico, provocado pela administração de uma segunda dose de CI. Algumas considerações devem ser analisadas para interpretar tais dados.

Nota-se que, somente o perfil de estadiamento da insulite, tal qual realizado, não consiste de um elemento suficientemente preciso para medir o grau de acometimento pancreático. Os dados foram baseados no número total de ilhotas detectado nos cortes de pâncreas, parâmetro de difícil quantificação metodológica, devido a grande variabilidade entre os cortes. Notou-se, entretanto, que o número total de ilhotas diminuiu, sensivelmente, na medida em que aumentou o número de ilhotas apresentando os graus mais intensos de infiltração. Não existem, porém, dados disponíveis na literatura sobre uma análise histológica quantitativa precisa da evolução da insulite em camundongos NOD. Estudos sobre o DMID espontâneo do camundongo NOD (MIYAZAKI et al., 1985; SIGNORE et al., 1989) constaram da interpretação da proporção de ilhotas, em diferentes graus de infiltração, em função da idade dos animais, por análise histológica convencional com coloração hematoxilina-eosina. Possivelmente, em virtude das dificuldades expostas acima, não foram citados, nestes estudos, os números precisos de ilhotas de acordo com a intensidade da insulite.

Um fator que agravou esta análise quantitativa foi a não detecção histológica precisa, nos pâncreas dos animais NOD estudados, de ilhotas remanescentes, após destruição das células β pela insulite. Foi realizada uma análise imunocitoquímica de ilhotas, com soro antiinsulina, em paralelo ao estadiamento histológico da insulite, em alguns cortes de pâncreas. Observou-se uma nítida diminuição da imunorreatividade, *in situ*, das células β insulino-secretoras, segundo a intensidade da insulite (RESULTADOS, Figura 11). Esta análise não foi estendida, porém, a todos os cortes pancreáticos avaliados em histologia, pois teve como objetivo principal auxiliar o critério de escolha do estadiamento da insulite. Mas possivelmente a identificação imunocitoquímica de insulina e, principalmente, de outros hormônios insulares, seja uma alternativa adequada a ser adotada para um estudo quantitativo preciso de ilhotas e do melhor estadiamento da insulite. Recentemente, JANSEN et al. (1994), reestadiou a insulite inicial do camundongo NOD (colônia NOD do Hospital Necker, Paris), por método imuno-histoquímico. Este estudo mostrou uma análise quantitativa de ilhotas, baseada na identificação de células β e α , com soros antiinsulina e antiglucagon, respectivamente.

Apesar das restrições ao método quantitativo utilizado, as alterações histológicas descritas neste estudo, nos animais tratados por CI (desvio do perfil de ilhotas normais para ilhotas com insulite de grau intenso), foram marcantes. Elas ocorreram, de forma rápida e reprodutível, nas duas primeiras semanas que sucederam a primeira dose de CI, momento em que o número médio de ilhotas/corte de pâncreas não estava ainda muito reduzido. Este período, precedeu de forma imediata o aparecimento de hiperglicemia definitiva nos animais, estabelecendo-se a síndrome clínica característica do DMID.

Assim sendo, neste estudo, definiu-se como janela terapêutica curativa, o período escolhido para imuno-intervenção, no qual já estava instalado o processo auto-imune *in situ*, designado por insulite pancreática em fase avançada de evolução. O momento de estabelecimento majoritário de insulite invasivo-destrutiva foi estimado como sendo em torno do 10º dia após a primeira injeção de CI, considerado, então, dia 1 do protocolo de imuno-intervenção com os AcMos.

A grande e rápida invasão linfocitária das ilhotas, indutível por uma dose de CI, foi também demonstrada nos estudos citados de DMID-CI em NOD/Wehi. Entretanto, as diferenças entre NOD/Wehi e as demais linhagens NOD, quanto à frequência de insulite espontânea, de causa não esclarecida, dificultam a comparação dos dados.

A associação de um estudo longitudinal da massa residual e da função das células β insulino-secretoras seria uma contribuição para caracterizar o grau de lesão destas células nos modelos de DMID-CI. Foi documentado, apenas em NOD/Wehi, uma diminuição *in vitro* variável, no conteúdo total de insulina pancreática após CI (KAY, CAMPBELL, HARRISON, 1991). O conhecimento da particular disfunção β no DMID espontâneo de acordo com a intensidade da insulite, atrofia versus inflamação, por inibição funcional reversível, é tema de fundamental importância, como discutido na revisão de BACH (1994a). STRANDEL, EIZIRIK, SANDLER (1990) demonstraram a reversibilidade funcional *in vitro* de células β , em fases iniciais de insulite espontânea, em NOD fêmeas.

Variações na intensidade de lesão das células β , de forma quantitativa e/ou qualitativa, poderiam ocorrer *in vivo*, no curso do modelo de DMID com duas doses de CI. Uma das estratégias para confirmar tal hipótese seria a realização conjunta de uma análise quantitativa da progressão da insulite, do ponto de vista histopatológico, e da evolução da massa residual das células β , em cada animal. Existem, porém, limitações experimentais para adaptar-se, nos camundongos, um tipo de teste funcional *in vivo*, de fácil realização, para medir a reserva de células β , como é a dosagem de peptídio C plasmático após estimulação com glucagon, praticado na clínica humana. Outros estudos dinâmicos clássicos de função da célula β poderiam, entretanto, ser aplicados, como o estudo da primeira fase de insulino-secreção por perfusão de pâncreas, já realizado por KANO et al. (1986) em camundongos NOD.

Uma estratégia de estudo *in situ*, rigoroso, da lesão β no DMID, seria a análise morfométrica ultra-estrutural da ilhota, como descrito por GOMEZ DUMN, SEMINO, GAGLIARDINO (1989), num modelo de diabetes espontâneo, em ratos. Uma abordagem quantitativa precisa das alterações morfológicas da célula β , incluindo identificação imunocitoquímica de hormônios insulares, de acordo com a intensidade da insulite, não foi ainda avaliada no camundongo NOD. Possivelmente, estas observações também contribuiriam para o esclarecimento da patogênese da hiperglicemia nos dois modelos de DMID-CI (I e II) que foram utilizados neste estudo.

Finalmente, um dado imunopatológico também relevante, a avaliar-se no modelo de DMID-CI, seria a presença de sinais de regeneração da ilhota. O desenvolvimento de ilhotas ductais, após destruição de células β , foi descrito em pâncreas de indivíduos com DMID de recente diagnóstico (GEPTS & DeMAY, 1978; SOMOZA et al., 1994). As capacidades de regeneração e de recuperação funcional da célula β , durante a evolução do ataque imune, seriam características adicionais a serem estudadas no modelo de DMID-CI do camundongo NOD.

5.1.4. Fenótipo da insulite: aspectos imuno-histoquímicos

O fenótipo de subpopulações de células T, implicadas na insulite do DMID-CI, foi previamente estudado por CHARLTON et al. (1989) e KAY, CAMPBELL, HARRISON (1991), em camundongos NOD/Wehi. Os autores concordaram em demonstrar um perfil sequencial de infiltração pancreática: predomínio de células T CD4⁺ até sete dias após a injeção de CI (relação CD4:CD8 > 2,0), e posterior aumento de células T CD8⁺ (relação CD4:CD8 = 1,0) acompanhando os graus avançados de insulite. O último grupo de autores descreveu, em pâncreas de fêmeas NOD-Lt de onze a dezesseis semanas de idade, um perfil CD4:CD8 comparável ao de NOD/Wehi tratados por CI, salientando o aumento relativo de células T CD8⁺ (CD4:CD8 < 1,0) em animais com diabetes clínico recente. O estudo citado diferenciou-se, porém, dos demais, por apresentar dados de fenótipo, por citometria de fluxo, de células T, isoladas e purificadas a partir de pâncreas, e não uma análise imuno-histoquímica, *in situ*, convencional. Possíveis diferenças de detecção metodológica devem ser consideradas.

Os resultados deste trabalho, sobre a análise qualitativa do fenótipo da insulite no Modelo II de DMID-CI, corroboraram os achados acima descritos. A insulite constituiu-se, predominantemente, por linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, e, em menor grau, por células B e macrófagos (não documentado). A análise longitudinal dos animais tratados por CI mostrou que, os graus avançados de insulite estavam associados com um aumento da proporção de células T CD8⁺. Não foi realizada uma análise quantitativa, tampouco um estudo diferencial detalhado, entre animais clinicamente diabéticos e não diabéticos. Este dado não está, contudo, bem esclarecido na literatura. Em estudo prévio, TAKI et al. (1991) citou, sem documentar, uma proporção similar de células T CD4⁺ e CD8⁺ em ilhotas de animais NOD/Shi/Kbe, em análise pontual, quatro semanas após a primeira dose de CI. SIGNORE et al. (1989), ao avaliar a história natural da infiltração insular em fêmeas NOD-Lt, descreveu que, a subpopulação T CD4⁺ (L3T4⁺) foi sempre predominante sobre a CD8⁺ (Lyt2) em pâncreas de animais de cinco a trinta e seis semanas de idade. Os autores realizaram uma análise de proporções relativas sobre o total de células infiltrantes

das ilhotas e, não discriminaram o fenótipo linfocitário, de acordo com os diferentes graus de insulite ou a presença de diabetes clínico.

Apesar da realidade experimental da mediação das células T CD4+ e CD8+ na patogênese do DMID do camundongo NOD, faltam documentações imuno-histológicas quantitativas precisas, da participação destas células, na ontogênese do infiltrado insular espontâneo. Com o aprimoramento das técnicas morfométricas, estudos do processo auto-imune *in situ* poderão ser complementados para determinarem-se as proporções parciais destas subpopulações T, juntamente com a destruição de células β , também passível de quantificação. Esta análise fenotípica da insulite, no modelo de DMID-CI, cumpriu o objetivo básico de corroborar a presença preponderante de células T CD4+ e CD8+, alvos da estratégia de imunoterapia utilizada.

5.1.5. Conclusões

De modo geral, os dados apresentados sugerem que, o DMID-CI é similar, imuno-histologicamente ao lento processo auto-imune que ocorre espontaneamente na linhagem NOD estudada. A vantagem do modelo de DMID-CI consiste na evidente sincronização na evolução do infiltrado insular, encurtando, de forma apreciável, a conseqüente instalação de diabetes clínico nos animais assim tratados. A possibilidade de estudar-se um grande número de animais NOD fêmeas e, sobretudo machos, com idêntico potencial para desenvolver DMID clínico, é de fundamental importância para a aplicação de protocolos de imuno-intervenção da doença.

5.2. TRATAMENTO DO DMID-CI DO CAMUNDONGO NOD COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTICD4 E ANTICD8

Nosso objetivo principal foi determinar se a imuno-intervenção, dirigida às células T, seria capaz de bloquear o DMID-CI (Modelo II: duas injeções de CI) do camundongo NOD em estágio avançado da doença auto-imune, considerando-se, como

parâmetro, a presença de insulite pancreática intensa. A janela terapêutica curativa consistiu de um período de dez dias para imuno-intervenção, a partir do 10º dia após a primeira dose de CI. O dia de início da terapia coincidiu com um momento de rápida invasão e destruição das ilhotas, cujo infiltrado estava, então, dominado por linfócitos T CD4+ e CD8+. Do ponto de vista clínico, tratou-se de momento onde 11% das fêmeas e 3% dos machos desenvolveram sintomas permanentes de síndrome hiperglicêmica (RESULTADOS, Figuras 5 e 6).

O tipo de estratégia terapêutica utilizada foi importante em dois níveis. O primeiro, é eminentemente clínico e o segundo, é fundamental, relacionado com os mecanismos imunopatológicos celulares, implicados na destruição das células β pancreáticas no DMID do camundongo NOD.

5.2.1. Protocolo de imuno-intervenção

Este estudo consistiu de imuno-intervenção transitória do DMID-CI do camundongo NOD com AcMos de rato (COBBOLD et al., 1984), depletantes *in vivo* de células T CD4+ ou CD8+. Inicialmente, foi determinada a dose mínima necessária de cada AcMo para causar o efeito biológico desejado, *in vivo*, em animais NOD da colônia INSERM U-25, avaliada no nível do baço (MATERIAS E MÉTODOS, cf 3.3). As doses efetivas mínimas, em nossos ensaios, 250 μ g/injeção i.p. do AcMo antiCD4 (YTS-191.1.2) e 100 μ g/injeção i.p. do AcMo antiCD8 (YTS-169.4.2), foram determinadas com base em critérios de análise fenotípica dose-resposta de depleção celular por AcMos, descritos na literatura (GORONZY, WEYAND, FATHMAN, 1986; QIN et al., 1987).

Posteriormente, foi elaborado um protocolo de imuno-intervenção do DMID-CI, de curta duração (dez dias), após escolha da janela terapêutica curativa, situada entre o 10º e o 20º dias consecutivos à primeira dose de CI. O protocolo constou de cinco injeções dos AcMos, sendo três consecutivas, no início do tratamento, e duas em intervalos de quatro e cinco dias, administradas após a segunda dose de CI. Este tipo de protocolo

terapêutico, com doses iniciais consecutivas e doses de manutenção, tem sido utilizado por outros autores para obtenção de níveis de saturação satisfatórios, de ligação de AcMos com antígenos-alvo (no caso, L3T4a e Lyt2), em linfócitos circulantes (SHIZURU et al., 1988; HUTCHINGS et al., 1992).

5.2.2. Efeito sobre o fenótipo dos linfócitos T esplênicos

O tratamento com os AcMos empregados causou imediata depleção, *in vivo*, das subpopulações T alvos periféricas e foi avaliado o grau de reconstituição das mesmas, estudando-se esplenócitos, após o período da imunoterapia. Salienta-se que, esta depleção linfocitária não foi absoluta, fato concordante com a descrição original de BENJAMIN & WALDMANN (1986) de 10% de células T CD4+ remanescentes, em órgãos linfóides periféricos, após tratamento com altas doses (1,2 g) de YTS-191.1.2. Observou-se, em nossos experimentos, reconstituição parcial de células T CD4+ (79%) e CD8+ (53%) periféricas, três semanas após o término do tratamento com os AcMos específicos, respectivamente. Entretanto, os animais tratados com YTS-169.4.2 (antiCD8) apresentaram recuperação mais lenta das células depletadas que os tratados com YTS-191.1.2 (antiCD4). Dados prévios demonstraram que, a cinética de repopulação linfocitária, após tratamento *in vivo* com AcMo depletante, seria dose-dependente, observando-se que doses > 30 µg de GK1.5 (IgG2b de rato antiCD4, desenvolvido por DIALYNAS et al., 1983) associaram-se com períodos de reconstituição maiores que quatro semanas, em camundongos BALB/c (GORONZY, WEYAND, FATHMAN, 1986).

5.2.3. Efeito sobre o DMID-CI clínico

Foi demonstrado diretamente que, ambos tratamentos transitórios com AcMos depletantes de células T CD4+ ou de T CD8+ exercem um similar efeito inibitório do DMID clínico, no curso de sua indução pela CI, em animais NOD machos e fêmeas.

Além da curta duração, a imuno-intervenção foi eficaz com doses totais baixas dos AcMos utilizados, YTS-191.1.2 (AcMo antiCD4): 1,25 mg/animal e YTS-169.4.2 (antiCD8): 0,5 mg/animal. Salienta-se que, estas são as menores doses descritas de AcMos antiCD4 e antiCD8 depletantes, associadas a sucesso terapêutico do DMID do camundongo NOD.

Eficácia terapêutica comparável, no modelo DMID-CI, foi descrita por CHATENOUD et al. (1994), no laboratório INSERM U-25, graças a um breve tratamento de baixas doses com um AcMo depletante antiCD3 (IgG de hamster - 145 2C11). Os autores obtiveram proteção do DMID clínico com um protocolo de cinco injeções consecutivas de 5 µg/dia de AcMo antiCD3, entre os dias 13 e 17, após a primeira dose de CI. Este mesmo protocolo terapêutico estabeleceu 64-80% de remissões a longo prazo (doze meses), quando aplicado na primeira semana de diagnóstico do DMID clínico, a um grupo de 36 fêmeas NOD, espontaneamente diabéticas.

Apesar da eficiência terapêutica do OKT3 (IgG2a de camundongo anticomplexo molecular CD3 humano) como potente agente imunossupressor para tratar e prevenir alotransplantes (CHATENOUD et al., 1983), a administração *in vivo* de AcMo antiCD3 é mal tolerada clinicamente. As primeiras injeções de antiCD3 provocam uma síndrome associada à ativação de células T, com intensa liberação de várias citocinas (FERRAN et al., 1990). Neste contexto, os AcMos antiCD4 e antiCD8 são potencialmente interessantes, pois não acarretam ativação celular T. A depleção mediada por estes AcMos é decorrente, principalmente, de opsonização por células do sistema retículo-endotelial, sendo secundária a citotoxicidade complemento dependente (BENJAMIN & WALDMANN, 1986). Não se observaram efeitos colaterais no extenso grupo de NOD machos e fêmeas que recebeu o protocolo de imuno-intervenção (n = 138), neste estudo.

Outros três estudos foram descritos na literatura, visando o tratamento curativo do DMID espontâneo do camundongo NOD, através de intervenção em linfócitos T. SHIZURU et al. (1988) demonstrou, pela primeira vez, a eficiente ação de um AcMo antiCD4 depletante (GK1.5) na proteção ao DMID clínico espontâneo em 23/25 (92%) fêmeas NOD, de treze a dezesseis semanas de vida, idade associada com a presença de

insulite intensa nestes animais. A dose total de AcMo, empregada pelos autores, foi entre 2,7 a 3,0 mg/animal, administrada semanalmente durante cinco a seis meses.

Os demais estudos foram aplicados a camundongos NOD com recente desenvolvimento de DMID clínico. SEMPÉ et al. (1991) demonstrou, pela primeira vez, a possibilidade de imuno-intervenção do DMID clínico estabelecido. Os autores administraram, durante uma semana, um AcMo não depletante antiTCR $\alpha\beta$ (H57-597, IgG de hamster), em altas doses (3 mg/animal), quatro dias após o diagnóstico do DMID, num pequeno grupo de oito fêmeas NOD. Houve, porém, remissão a longo prazo (dez meses de acompanhamento) somente em 37,5% dos animais assim tratados. O efeito deste tratamento sobre a insulite não foi estudado.

MAKI et al. (1992) foi o primeiro a obter remissão efetiva do DMID espontâneo recentemente diagnosticado em camundongos NOD. O tratamento com soro antilinfocitário (ALS: "anti-lymphocyte serum") de coelho, administrado nos catorze primeiros dias de início do DMID clínico (duas injeções de 0,4 ml), promoveu 76% de remissões a longo prazo (até trinta e um meses de acompanhamento), num grupo de quarenta animais machos e fêmeas. O sucesso deste tratamento, que se associou à depleção de células T periféricas CD4+ e CD8+, foi semelhante ao obtido após o uso combinado de AcMos depletantes antiCD4 (GK1.5) e antiCD8 (116-13.1, IgG de rato), durante três semanas, nas doses de 4 e 1 mg, respectivamente. Um importante fator, porém, a ser frisado neste estudo, foi a insulino-terapia intensiva, realizada em todos os animais sob imuno-intervenção, até alcance de normoglicemia, período de aproximadamente noventa dias. Assim, não se pode descartar um efeito benéfico desta insulino-terapia na melhor preservação da função das células β pancreáticas, como demonstraram, inicialmente, SHAH, MALONE, SIMPSON (1989) na indução de remissões no DMID humano. Além desta possibilidade, existe a hipótese, considerada atualmente, de que a insulino-terapia induziria tolerância imunológica, seja por modulação da atividade linfocitária T (HELDERMAN, PIETRI, RASKIN, 1983), seja por promoção de repouso da célula β e conseqüente menor expressão de auto-antígenos (APPEL et al., 1989).

O resultado terapêutico clínico, obtido neste estudo, não foi completo. O efeito dos AcMos antiCD4 e antiCD8 não atingiu a totalidade dos animais tratados, havendo, no final do período experimental, 19 e 30% de animais hiperglicêmicos após terapia com YTS-169.2.4 (antiCD8) e YTS-191.1.2 (antiCD4), respectivamente. Estes dados devem ser analisados com base ao importante conceito revisado por BACH (1994a), resultado de diversos ensaios terapêuticos, de que a imuno-intervenção do DMID avançado seria factível quando realizada em presença de células β remanescentes viáveis. Contudo, a quantificação da massa β residual limite, para preservar normoglicemia, segundo o tipo de terapia aplicada, não foi esclarecida, nem estudada nos trabalhos acima citados.

Além disso, a diferença entre atrofia e disfunção da célula β , no início do DMID clínico, seria de fundamental importância. Os dados sobre a recuperação da insulino-secreção, por eliminação *in vitro* de células mononucleares de ilhotas NOD com insulite invasiva (STRANDEL, EIZIRIK, SANDLER, 1990), suportam claramente uma fase de inibição funcional reversível. As condições, decorrentes da facilidade de obtenção do DMID-CI e de nosso protocolo terapêutico, que eliminou células T insulares *in vivo*, constituem um modelo clínico interessante para tal estudo. Uma futura associação de marcadores metabólicos e histológicos das células β poderá melhor precisar o momento, nas fases avançadas de insulite, de início da imuno-intervenção. É, pois, provável, que um dos fatores de ineficiência do tratamento com AcMos, em alguns animais de nossos ensaios, seja conseqüente à já bastante reduzida e/ou irreversivelmente lesada massa β pancreática destes animais, no início da terapia.

5.2.4. Efeito sobre a insulite

Para determinar os efeitos da administração dos AcMos YTS-191.1.2 (antiCD4) e YTS-169.2.4 (antiCD8) sobre a insulite dos animais NOD tratados, monitorizou-se a infiltração linfocitária nas ilhotas de Langerhans, através de estudo histológico e imuno-histoquímico. O curto tratamento com os AcMos causou depleção de

linfócitos-alvo insulares, observada logo após as três primeiras injeções do protocolo terapêutico. Esta depleção linfocitária específica intensificou-se até o término do estudo, três semanas após a última injeção dos AcMos. Entretanto, neste momento, o efeito sobre a progressão da insulite diferenciou-se entre os dois tratamentos.

Observou-se, no final do período de estudo, que os animais NOD tratados com YTS-191.1.2 (AcMo antiCD4) apresentaram infiltração insular restrita aos estádios iniciais, sobretudo periinsulite, não havendo evolução para a fase terminal de insulite (invasivo-destrutiva). As células T que predominaram no infiltrado insular dos animais assim tratados, foram CD8+. Apesar de alcançar similar proteção do DMID clínico, o tratamento com YTS-169.4.2 (AcMo antiCD8) associou-se com recorrência de infiltração intensa das ilhotas. A análise histológica/imuno-histoquímica dos pâncreas do grupo de animais tratados com AcMo antiCD8, realizada três semanas após o término do protocolo de imuno-intervenção, revelou predomínio de insulite invasivo-destrutiva, contendo, predominantemente, células T CD4+.

A presença de insulite, sem expressão clínica de hiperglicemia, tem sido amplamente discutida na literatura. Todos os estudos de imuno-intervenção do DMID avançado, acima citados, acompanhados de avaliação da insulite, referiram recorrência do infiltrado insular, após verificação de período de significativa redução do mesmo. Todos os estudos, salvo o de SEMPÉ et al. (1991), assim como este, utilizaram tratamentos que depletaram células T *in situ*

O controle poligênico da insulite do camundongo NOD está sendo amplamente pesquisado na atualidade (LEITER, SERREZE, PROCHAZKA, 1990; TODD et al., 1991; GARCHON et al., 1991). Um importante objetivo das análises genéticas é a caracterização dos genes de suscetibilidade, correspondentes às várias fases da doença. A periinsulite associa-se com um locus no cromossomo 1, vizinho ao gene Bcl-2 (GARCHON et al., 1991). A progressão da doença para as fases de insulite invasiva e DMID clínico dependeria do controle de vários e distintos loci, com interação de elementos do sistema imunológico (GHOSH et al., 1993). Assim, apesar da hiperglicemia franca ter sido sempre precedida de insulite invasivo-destrutiva, a presença de insulite não se associaria necessariamente com DMID clínico.

Periinsulite e normoglicemia foram achados de várias observações: 1) em machos NOD; 2) em várias linhagens de camundongos com diferentes "backgrounds" genéticos, apresentando falha de expressão de moléculas do CPH de classe II I-E (XIANGPING, GOLDEN, FAUSTMAN, 1993); 3) num modelo transgênico de expressão de um antígeno (CR2) em células β de camundongos com "background" genético não associado com DMID clínico espontâneo (HOLERS et al., 1993). Possivelmente, os eventos necessários para provocar a infiltração invasiva das ilhotas e destruição das células β , ainda não esclarecidos, poderão ser melhor elucidados com o auxílio dos modelos acima citados.

5.2.5. Mecanismos de ação dos AcMos antiCD4 e antiCD8 no tratamento do DMID-CI do camundongo NOD

Foi demonstrado, neste estudo, que os tratamentos isolados com AcMos depletantes antiCD4 ou antiCD8, iniciados em fase de insulite intensa, acarretaram um similar efeito clínico de proteção ao DMID-CI do camundongo NOD. Observou-se recorrência de insulite, que foi porém diferencial, segundo o AcMo utilizado: periinsulite nos animais tratados com YTS-191.1.2 (antiCD4), como descrito na literatura citada, e

insulite invasiva nos animais tratados com YTS-169.2.4 (antiCD8). A interpretação destes resultados pode ser discutida com base em dois mecanismos de ação destes AcMos:

- 1) de modo geral, pelas suas propriedades imunossupressoras, diretamente associadas à eliminação de linfócitos maduros periféricos, mecanismo descrito originalmente por COBBOLD, QIN, WALDMANN (1990), na indução de tolerância a alotransplantes;
- 2) de modo especificamente associado ao DMID desenvolvido pelo camundongo NOD, através da eliminação de subpopulações T (CD4+ e CD8+) diabetogênicas, mas que, provavelmente, apresentam relevâncias patológicas diferentes nas fases avançadas de insulite.

5.2.5.1. AcMo antiCD4

Em primeiro lugar, este estudo efetivou e corroborou a potente ação imunossupressora dos AcMos antiCD4. O benefício deste tratamento foi, também, compatível com a relevância da subpopulação T CD4+ na regulação da resposta imunológica (revisão de VOLPINI & TAMBASCIA, 1996a). Os resultados foram compatíveis com a maioria dos dados disponíveis na literatura, pois, ao menos nos modelos murinos, os AcMos antiCD4 depletantes mostraram uma reprodutível eficiência terapêutica em diversas situações patológicas, que incluem:

- a) rejeição de alotransplantes (COBBOLD, QIN, WALDMANN, 1990);
- b) doenças auto-imunes induzidas, como a Encefalite Alérgica Experimental (WALDOR et al., 1985), a Artrite Induzida por Colágeno Tipo II (RANGES, SRIRAM, COOPER, 1985), o Diabetes por Baixas Doses de STZ (HEROLD, MONTAG, FITCH, 1987), a Tireoidite Induzida por Tireoglobulina (HUTCHINGS et al., 1993);
- c) doenças auto-imunes espontâneas, como o Lupus Eritematoso (WOFSY & SEAMAN, 1987), e o DMID do camundongo NOD (SHIZURU et al., 1988 ; MAKI et al., 1992).

Os AcMos antiCD4 depletantes, utilizados nos trabalhos acima citados, GK1.5 ou YTS.191-1.2, foram associados com efeitos imunossupressores, demonstrados, *in vivo*, como: a inibição de respostas primárias e secundárias de anticorpos a antígenos T dependentes (GORONZY, WEYAND, FATHMAN, 1986), a tolerância a antígenos solúveis, administrados simultaneamente (COBBOLD, QIN, WALDMANN, 1990) e, a particularmente interessante ausência de imunização a eles próprios (todos são IgG2b originários de rato), quando utilizados em altas doses (BENJAMIN & WALDMANN, 1986).

Em segundo lugar, os mecanismos de indução de tolerância através de AcMo antiCD4 depletante, discutidos nas diversas patologias descritas, não foram, porém, completamente esclarecidos. No caso particular do diabetes auto-imune, cujo auto-antígeno primário não está totalmente definido, discutem-se alternativas, além da eliminação de células T CD4+ executoras da diabetogênese. Saliencia-se que, o sucesso terapêutico do DMID avançado com AcMo antiCD4, em bloquear a destruição das células β , associou-se com depleção transitória e nunca absoluta de linfócitos CD4+. BENJAMIN & WALDMANN (1986) discutiram a produção de um meio tolerogênico, com remoção e re-exposição de células T CD4+, de forma a permitir ao sistema imunológico re-aprender o próprio e limitar a progressão da autorreatividade. GORONZY, CORNELLA, FATHMAN (1986) propuseram que, uma composição alterada da população CD4+, durante a fase de regeneração, contribuiria para o efeito imunomodulador destes AcMos. MAKI et al. (1992) sugeriram que, a eliminação de linfócitos T executores poderia produzir um desequilíbrio que favoreceria um predomínio de células supressoras, como células veto (revisão de VOLPINI & TAMBASCIA, 1996a), mais resistentes à depleção.

A equipe dirigida por H.WALDMANN (COBBOLD et al., 1984), através do desenvolvimento de um painel de AcMos não depletantes antilinfocitários murinos, introduziu o importante conceito de que, a tolerância periférica em animais adultos pode ser obtida sem eliminação de células T CD4+. Assim, o bloqueio da molécula CD4 facilitaria a maior suscetibilidade das células T Th1 ("T helper 1") a um estado de anergia, havendo predomínio de respostas Th2 ("T helper 2")-"like", cuja relevância, como

mecanismo de regulação negativa, foi demonstrada em rejeição a alotransplantes (SCULLY et al., 1994). Utilizando o mesmo painel de AcMos, a equipe dirigida por A.COOKE descreveu, de forma única, o efeito protetor de um AcMo antiCD4 não depletante, no modelo de transferência do DMID, em camundongos NOD adultos (HUTCHINGS et al., 1992). Além do estudo basear-se num número restrito de animais, é necessário ressaltar que a sensibilidade à imuno-intervenção seria diferente no modelo de transferência estudado, em comparação ao modelo de DMID-CI. A migração de linfócitos poderia ser influenciada por várias estratégias imunomoduladoras que desviariam as células transferidas, impedindo a ocorrência da doença.

No contexto do DMID do camundongo NOD, poderíamos resumir que tanto o bloqueio da molécula CD4+, como a depleção limitada de células T CD4+ periféricas por AcMos específicos, favoreceriam um estado de tolerância, possivelmente mediado pela ação de citocinas capazes de modular a ação de células T diabetogênicas. Inúmeras questões fundamentais, relacionadas a esta hipótese continuam, porém, abertas, como: a suscetibilidade diferencial das células T à ação de AcMos depletantes, a posterior cinética de repopulação T e o eventual "switch" Th1/Th2. A falta de marcadores fenotípicos para identificação de células T supressoras é também um grande obstáculo para o esclarecimento de tais questões.

Entretanto, o conhecimento do papel central das células T CD4+ na mediação de várias doenças auto-imunes e o êxito obtido em modelos experimentais propiciaram os ensaios com AcMos antiCD4 na clínica humana. Estes, iniciaram-se em 1987, quando HERZOG et al. descreveu sucesso clínico no tratamento da Artrite Reumatóide, após sete dias de terapia com antiCD4 depletante (M-T151, IgG2a de camundongo). Este sucesso terapêutico foi confirmado (REITER et al., 1991), e iniciaram-se ensaios sobre outras patologias, como: Esclerose Múltipla (HAFLER et al., 1988), Doença de Crohn e Colite Ulcerativa (EMMRICH, 1991), Lupus Eritematoso Sistêmico (HIEPE et al., 1991) e Psoríase (NICOLAS et al., 1991). Apesar de tratar-se de uma experiência limitada, não foi descrito um risco aumentado de infecções ou tumores após imunossupressão com antiCD4 depletante. Houve, porém, desenvolvimento de anticorpos humanos anticamundongo

(denominação internacional = HAMA: "human anti-mouse antibody"), que podem ser bloqueadores. Para evitar a formação de HAMA, uma estratégia em desenvolvimento é a produção de AcMos terapêuticos humanizados, cuja porção murina restringe-se ao sítio de reconhecimento antigênico da molécula (GORMAN et al., 1991).

Por outro lado, a experiência na clínica humana com AcMo antiCD4 não depletante, é rara. O OKT4A é um exemplo de AcMo desta categoria, agindo por recobrimento das moléculas CD4+, sem promover modulação antigênica. Este AcMo é dirigido contra CD4 humano, mas reconhece, por reação cruzada, a molécula CD4 de macaco. CISINI et al. (1991) descreveu, então, a eficiência do OKT4A na prevenção de rejeição de alotransplantes de pele e rim, em macacos Rhesus e Cynomolgus. É desconhecida, entretanto, a capacidade deste AcMo no tratamento de reações imunológicas, já instaladas, no homem.

Finalmente, um importante aspecto da terapia com AcMos antiCD4, ainda não elucidado, é o seu efeito sobre células monocitárias/macrofágicas, que expressam a molécula CD4. Uma depleção moderada de monócitos circulantes foi descrita no tratamento da Artrite Reumatóide (HERZOG et al., 1989). O estudo da repercussão desta terapia, em células apresentadoras de antígenos, no modelo de DMID do camundongo NOD, teria interesse diretamente associado à imunopatogênese da doença. A participação destas células foi descrita, tanto no início da insulite, promovendo o recrutamento e ativação de linfócitos T intra-insulares (HUTCHINGS et al., 1990; LO et al., 1993), como nos mecanismos de destruição final da célula β (JANSEN et al., 1994).

5.2.5.2. AcMo antiCD8

Apresentou-se neste estudo o primeiro relato de benefício clínico com a depleção da subpopulação T CD8+, em fase avançada de insulite. MAKI et al. (1992) demonstrou, em observação única, fracasso de terapia isolada com AcMo depletante

antiCD8 (116-13.1) no tratamento de animais NOD, que apresentavam, porém, um DMID clínico recente, diferentemente de nosso estudo.

Entretanto, obteve-se em nossos ensaios, uma constatação não esperada, que favoreceu a compreensão dos dados de MAKI et al. (1992). O AcMo antiCD8 YTS-105.18.10 (IgG2a), apresentado neste estudo como AcMo controle, havia sido previamente selecionado por sua descrição como não depletante. Quando foram realizados os experimentos preliminares para definir a dose do AcMo a ser empregada, observou-se que, uma injeção de YTS-105.18.10 associava-se a um recobrimento completo de esplenócitos T CD8+ periféricos (baço). Este recobrimento foi detectado por marcação com Ac antiIg de rato, não sendo evidenciada modulação antigênica em nossos ensaios. Se este era o achado, após uma única injeção, a administração repetida de YTS-105.18.10, segundo o protocolo de imuno-intervenção, ocasionou depleção de esplenócitos T CD8+. A diferença, porém, do AcMo YTS-169.4.2, que provocou depleção imediata, detectou-se depleção tardia com YTS-105.18.10, após a terceira semana do protocolo e nenhum efeito protetor do mesmo ao DMID clínico.

Deve-se recordar que o perfil de evolução da insulite no modelo DMID-CI mostrou que, ao longo das semanas que seguiram a segunda dose de CI, ocorreu um aumento da proporção de ilhotas com insulite invasivo-destrutiva. Os resultados diferenciais com os AcMos antiCD8, sugerem que, uma imuno-intervenção durante a progressão da insulite do DMID-CI, mediada pela depleção de células T CD8+, seria somente eficaz se iniciada antes da fase terminal do processo imunopatológico pancreático. Animais NOD, clinicamente diabéticos, utilizados por MAKI et al. (1992), estariam em estágio avançado da doença, com supostamente mais de 70% de destruição das células β pancreáticas.

Do ponto de vista fundamental, os resultados deste estudo implicam em reflexões sobre a própria imunopatogênese do DMID do camundongo NOD. Uma hipótese para o fracasso terapêutico da depleção isolada de linfócitos T CD8+, em estádios muito

avanzados de insulite, seria a não intervenção destas células na fase final de destruição das células β .

Esta hipótese foi defendida numa série de trabalhos iniciados por WANG et al. (1991), com base na análise de isotransplantes de ilhotas em camundongos NOD clinicamente diabéticos. Os autores demonstraram que, somente a depleção de células CD4+, induzida *in vivo* pelo AcMo GK1.5, e não a de células CD8+, induzida pelo AcMo 116-13.1, seria capaz de proteger as ilhotas transplantadas de recidiva da doença auto-imune. Concluíram, então que, se a cooperação entre células T CD4+ e CD8+ é comprovadamente necessária para iniciar a fisiopatologia do DMID, a destruição das células β seria um processo inflamatório, T CD4+ dependente. Agentes tóxicos, como radicais livres e/ou citocinas, seriam os prováveis mediadores da lesão β , induzidos por células T CD4+. A favor desta hipótese estaria a possível sensibilidade diferencial das células β à ação destes agentes, um argumento amplamente explorado pelo grupo de Copenhagen (MANDRUP-POULSEN et al., 1986).

BRADLEY et al. (1992) sustentou esta hipótese através do isolamento, em camundongos NOD, de um clone T CD4+ específico contra ilhotas, capaz de destruir isotransplantes de ilhotas *in vivo*, possivelmente por dano inflamatório, sem requisição de células T CD8+. Estes dados não permitiram excluir, contudo, um recrutamento, *in situ*, de células T CD8+ do receptor.

Defendendo o papel de células T CD8+ como executoras finais da lesão β , está outro grupo de pesquisadores (NAGATA & YOON, 1992; NAGATA et al., 1994), que estabeleceram clones de células T CD8+ citotóxicos, a partir de ilhotas de camundongos NOD, capazes de destruir células β *in vitro*. A transferência isolada destes clones a camundongos NOD jovens não promoveu, porém, insulite ou diabetes clínico. O DMID clínico ocorreu somente quando co-transferidos com células T CD4+.

Recentes experiências de transferência do DMID em camundongos NOD imunodeficientes, NOD-"nude" (MATSUMOTO et al., 1993) e NOD-"scid" (CHRISTIANSON, SHULTZ, LEITER, 1993) foram concordantes ao demonstrarem que: 1) ambas subpopulações T CD4+ e CD8+ são necessárias para induzir DMID; 2) a transferência isolada de células T CD4+ produz insulite, caracterizada, sobretudo, como periinsulite; 3) a presença de células T CD4+ no pâncreas é necessária, tanto para a migração, como para a ativação de células T CD8+ nas ilhotas. Apesar de estar atualmente corroborado que o desenvolvimento de insulite invasivo-destrutiva e DMID clínico são CD4+ e CD8+ dependentes, a patogênese da destruição final da célula β não está ainda esclarecida.

5.2.6. Perspectivas

A detalhada análise morfológica, realizada neste estudo, sobre a cinética de evolução da insulite no modelo DMID-CI do camundongo NOD, constitui a base para a modulação de futuros protocolos de imuno-intervenção. Em primeiro lugar, a adaptação de novas janelas terapêuticas poderá contribuir para a compreensão do processo final de destruição da célula β pancreática. Possíveis modelos para assim testar a participação dos linfócitos T CD4+ seriam protocolos de intervenção com AcMo depletante antiCD4, iniciados em diferentes momentos após a segunda dose de CI, e dimensionados à progressão da intensidade da insulite e ao desenvolvimento do DMID clínico.

Em segundo lugar, a elaboração de associações terapêuticas poderia resultar em benefício clínico na indução de tolerância, como demonstrado na prevenção da rejeição de alotransplantes em camundongos, pela equipe de H.WALDMANN. Estas associações concernem a combinação de AcMos, dirigidos não apenas contra diferentes epitopos do mesmo antígeno de superfície das células T, como descrito com pares de antiCD4 depletantes (QIN et al., 1987), mas também contra as diferentes subpopulações T CD4+ e CD8+ (QIN et al., 1989). Estas associações teriam, também, como objetivo, reduzir a dose

total terapêutica de anticorpo requerida, por potenciar efeitos sinérgicos *in vivo* sobre as células T.

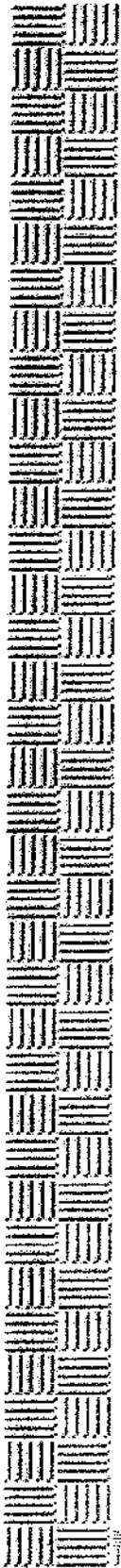
Em terceiro lugar, seria importante analisar se a resposta terapêutica obtida é intermediária, ou seja, se existe proteção transitória ou permanente ao DMID-CI. Para tal, este estudo deveria ser complementado com:

- a) maior tempo de observação experimental;
- b) testes do estabelecimento da tolerância, como a análise das respostas a antígenos não provenientes da célula β pancreática (HUTCHINGS et al., 1992) e alotransplantes de pele de diferentes graus de histocompatibilidade (SEMPÉ et al., 1991; MAKI et al., 1992; CHATENOUUD et al., 1994), para observar-se o grau e especificidade da imunossupressão alcançada nos animais tratados com os AcMos descritos;
- c) inclusão de estratégias com objetivo de tentar romper um provável estado de tolerância nos animais tratados, como a re-administração de CI (PARISH et al., 1993).

Finalmente, os modelos: DMID-CI do camundongo NOD e os Protocolos de Imuno-intervenção do DMID-CI com os AcMos descritos, apresentam-se oportunos para o estudo de mecanismos de tolerância periférica. A presença crucial de células T, reguladoras da resposta auto-imune contra β -antígenos, necessita ser elucidada. A análise quantitativa e funcional das células T supressoras é passo fundamental para a compreensão da imunopatogênese do DMID e conseqüente adequação de protocolos imunoterapêuticos. Seria importante dirigir os esforços para o empreendimento de estratégias experimentais, como a caracterização de marcadores de superfície celular, que permitam a posterior identificação fenotípica destas populações T supressoras no camundongo NOD. Assim sendo, foi iniciada, no contexto deste estudo, a caracterização do antígeno Rt-6 do camundongo (VOLPINI et al., observação não publicada), cujo homólogo, no rato, é sabidamente um marcador de células T com função de regulação negativa da resposta imunológica, inclusive do DMID do rato BB (GREINER et al., 1987).

Este estudo reforça a idéia de que a imunoterapia do DMID é uma área de grandes progressos. Paralelamente aos avanços para caracterizar-se o auto-antígeno primário da doença, são evidentes os benefícios dos AcMos antiCD4 na indução de tolerância, mesmo em fase avançada do processo auto-imune, explorada em nível experimental. Os ensaios em clínica humana têm demonstrado que se trata de um tratamento em potencial, cuja importância está sendo focalizada com rigor pela comunidade científica, para que se possa expandí-lo com critério (BACH, 1994b). O caráter ético dos protocolos imunoterapêuticos requer uma avaliação precisa dos riscos de imunossupressão e gênese de neoplasias a que seriam expostos os pacientes, a médio e longo prazo, comparados aos benefícios clínicos. Estes riscos são, contudo, freqüentemente difíceis de serem mensurados *a priori*, e normas para o uso racional de diferentes tratamentos imunológicos estão sendo estudadas.

Por outro lado, é também evidente que a imuno-intervenção do DMID deve ser instalada em presença de massa β pancreática viável e, é mais efetiva, quando iniciada precocemente, em fase pré-clínica. Este fator implica no diagnóstico precoce do DMID, com determinação dos indivíduos de risco, baseando-se nos marcadores imunogenéticos e metabólicos, padronizados internacionalmente. O perfil imunogenético do DMID, na população brasileira, tão heterogênea na sua composição étnica é, porém, pouco conhecido. Fomentar tais estudos, em caráter multicêntrico é, pois, um pré-requisito para que se possa racionalizar a aplicação de protocolos de imuno-intervenção do DMID, no Brasil.



6. Conclusões

- I. Camundongos NOD machos e fêmeas (linhagem de alta frequência de DMID clínico) apresentaram perfis evolutivos similares de insulite, induzidos após uma ou duas doses de ciclofosfamida (200 mg/kg/dose). Foi evidenciado um momento preciso no tempo de progressão uniforme de ilhotas apresentando insulite intensa (invasivo/destrutiva) e paralela diminuição de ilhotas normais ou com periinsulite. Este momento, situado entre o 7º e o 14º dias após a primeira dose de ciclofosfamida, foi considerado como o de estabelecimento de doença auto-imune no pâncreas. Apesar do comparável efeito sobre a progressão da insulite entre os modelos com uma e duas injeções de ciclofosfamida, a expressão do DMID clínico foi significativamente aumentada pela segunda dose da droga. A análise qualitativa do fenótipo dos linfócitos T presentes na insulite, induzida pela ciclofosfamida, demonstrou similaridade com a insulite espontaneamente desenvolvida por camundongos NOD fêmeas. Os estádios iniciais de insulite foram caracterizados por predomínio de células T CD4+ e, os finais, por aumento na proporção de células T CD8+.
- II. Foi caracterizada, no modelo de DMID acelerado por duas doses de ciclofosfamida, uma janela para aplicação de protocolos terapêuticos, visando o tratamento do diabetes auto-imune em fase avançada, pelo predomínio de insulite intensa e início de DMID clínico. O momento crítico para começo da intervenção localizou-se em torno do 10º dia após a primeira dose de ciclofosfamida.
- III. Foi evidenciada a possibilidade de prevenir-se o DMID-CI clínico, utilizando-se protocolo transitório e de baixas doses com anticorpos monoclonais depletantes de linfócitos T CD4+ e CD8+, em fase avançada de insulite. O tratamento isolado, com anticorpo monoclonal antiCD4, impediu a progressão da insulite para as fases evolutivas finais. O anticorpo monoclonal antiCD8 apresentou sucesso clínico similar ao encontrado com antiCD4, apesar de não ter sido observado efeito de bloqueio na evolução de insulite intensa.



7. Summary

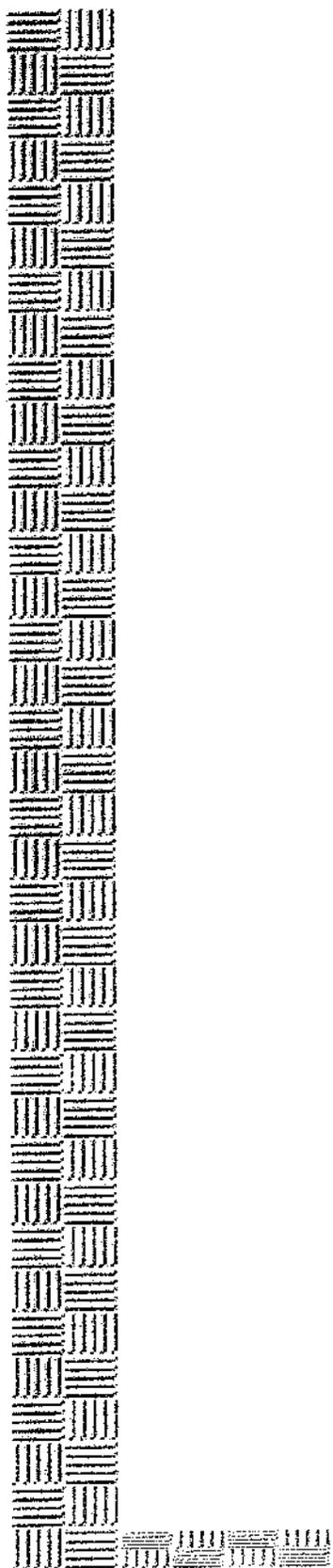
The NOD (non obese diabetic) mouse is a model of spontaneous autoimmune diabetes, in which expression of the hyperglycemic syndrome occurs between 20 and 25 weeks of age and is more common in females (about 60%) than in males (< 10%). A progressive infiltration of the islets of Langerhans by lymphomononuclear cells (insulinitis) precedes the development of the clinical diabetes condition in both sexes. This diabetes is mediated by CD4+ and CD8+ T cells with autoreactivity against β cells.

Cyclophosphamide (CY) administered to eight week-old NOD mice induces clinical diabetes in males and accelerates its development in females, probably by depleting the T suppressor cells of diabetogenic mechanisms. CY-induced insulin-dependent diabetes mellitus model (CY-IDDM) provides a useful experimental approach for investigating the application of therapeutic protocols in the initial phase of the autoimmune process. The aim of the present study was to examine the role of an intervention in advanced insulinitis phase of CY-IDDM in NOD mice with depleting anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies (MoAbs).

The evolution of the insulinitis induced by cyclophosphamide was initially characterized by administering two doses of 200 mg/kg separated by a 14-day interval in order to determine the appropriate therapeutic window. The histological analysis of insulinitis in male and female NOD mice yielded similar results for both sexes and showed that the period of rapid progression of advanced invasive/destructive insulinitis was paralleled by a reduction in the number of normal or peri-insulinitis islets. This period of insulinitis development occurred between the 7th and the 14th day after the first CY injection and was considered to represent the establishing of the immunopathologic process in the pancreas. The clinical expression of IDDM was significantly increased within two weeks after the second CY dose (80% in both sexes). Based on immunohistochemical analysis the CY-induced insulinitis showed a phenotypic evolution similar to that spontaneously developed in NOD mice with the predominance of CD4+ T cells in the initial phase and an increased proportion of CD8+ T cells in the advanced phase.

CY-induced IDDM could be prevented by treating the mice with depleting anti-CD4 and anti-CD8 MoAbs. This treatment was initiated at a critical moment in the progress of the invasive/destructive insulinitis (10 days after the first CY dose). Therapeutic success was achieved with in a short time (10 days) and at low total doses of MoAbs (0.5 to 1.25 mg/mouse). Anti-CD4 but not anti-CD8 MoAbs prevented the insulinitis from evolving to its final stages.

These results clearly indicate the potential clinical usefulness of anti-CD4 and anti-CD8 MoAbs in abolishing or neutralizing the activity of specific subpopulations involved in the autoimmune destruction of β cells.



8. Referências bibliográficas

- AAEN, K.; RYGARD, J.; JOSENSON, K.; PETERSEN, H.; ROGREN, C.H.; HORN, T.; BUSCHARD, K. - Dependence of antigen expression on functional state of cells. **Diabetes**, 39:697-701, 1990.
- ACHA-ORBEA, H. & McDEVITT, H.O. - The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84:2435-9, 1987.
- APPEL, M.C.; DOTTA, F.; O'NEIL, J.; EISENBARTH, G.S. - Beta cell activity regulates the expression of islet antigenic determinants. **Diabetologia**, 32:461A, 1989. (Abstract)
- ATKINSON, M.A.; KAUFMAN, D.L.; CAMPBELL, L.; GIBBS, K.A.; SHAH, S.; BU, D.F.; ERLANDER, M.G.; TOBIN, A.J.; McLAREN, N.K. - Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. **Lancet**, 339:458-9, 1992.
- ATKINSON, M.A. & MACLAREN, N.K. - Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. **J. Clin. Invest.**, 92:1608-16, 1993.
- BACH, J.F. - Ethics, legal regulation, and therapeutic trials. **The Immunologist**, 2/4:135-7, 1994b.
- BACH, J.F. - Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocrine Rev.**, 15: 516-42, 1994a.
- BACH, J.F.; FRACCHIA, G.N.; CHATENOU, L. - Safety and efficacy of therapeutic monoclonal antibodies in clinical therapy. **Immunol. Today**, 14:421-5, 1993.
- BACH, J.F. & STROM, T.B. - Alkylating agents. In: NEUBERGER, A., TATUM, E.L. - **The mode of action of immunosuppressive agents**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p.175-239.

- BAXTER, A.G. & MANDEL, T.E. - Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice. **Eur. J. Immunol.**, 21:2051-5, 1991.
- BENDELAC, A.; CARNAUD, C.; BOITARD, C.; BACH, J.F. - Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. **J. Exp. Med.**, 166:823-32, 1987.
- BENJAMIN, R.J. & WALDMANN, H. - Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. **Nature**, 320:449-51, 1986.
- BERNARD, N.F.; ERTUG, F.; MARGOLESE, H. - High incidence of thyroiditis and anti-thyroid autoantibodies in NOD mice. **Diabetes**, 41:40-6, 1992.
- BOITARD, C.; TIMSIT, J.; ASSAN, R.; MOGENET, A.; DEBUSSCHE X.; KALOUSTIAN, E.; ATTALI, J.R.; CHANSON, P.; CHATENAUD, L.; WOODWORTH, T.; BACH, J.F. - Treatment of type I diabetes mellitus with DAB486-II2, a toxin conjugate which targets activated T-lymphocytes. **Diabetologia**, 35(Suppl.1):A218, 1992. (Abstract)
- BOITARD, C.; YASUNAMI, R.; DARDENNE, M.; BACH, J.F. - T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. **J. Exp. Med.**, 169:1669-80, 1989.
- BOTTAZZO, G.F.; DEAN, B.M.; McNALLY, J.M.; MacKAY, E.H.; SWIFT, P.G.; GAMBLE, D.R. - In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. **N. Engl. J. Med.**, 313:353-60, 1985.
- BOTTAZZO, G.F.; FLORIN-CHRISTENSEN, A.; DONIACH, D. - Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. **Lancet**, 2:1279-83, 1974.

- BOUCHARD, P.; SAI, P.; REACH, G.; CAUBARRERE, I.; GANEVAL, D.; ASSAN, R.
- Diabetes mellitus following pentamidine-induced hypoglycemia in humans.
Diabetes, 31:40-5, 1982.
- BOWMAN, M.A.; LEITER, E.H.; ATKINSON, M.A. - Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. **Immunol. Today**, 15:115-20, 1994.
- BRADLEY, B.J.; HASKINS, K.; La ROSA, F.G.; LAFFERTY, K.J. - CD8 T cells are not required for islet destruction induced by a CD4+ islet-specific T-cell clone. **Diabetes**, 41:1603-8, 1992.
- CASTAÑO, L. & EISENBARTH, G.S. - Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. **Annu. Rev. Immunol.**, 8:647-79, 1990.
- CHARLTON, B.; BACELJ, A.; MANDEL, T.E. - Administration of silica particles or anti-Lyt2 antibody prevents β -cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. **Diabetes**, 37:930-5, 1988.
- CHARLTON, B.; BACELJ, A.; SLATTERY, R.M.; MANDEL, T.E. - Cyclophosphamide-induced diabetes in NOD/Wehi mice. Evidence for suppression in spontaneous autoimmune diabetes mellitus. **Diabetes**, 38:441-7, 1989.
- CHARLTON, B. & MANDEL, T.E. - Progression from insulinitis to β -cell destruction in NOD mouse requires L3T4+ T-lymphocytes. **Diabetes**, 37: 1108-12, 1988.
- CHATENOUD, L. - Monoclonal antibodies. **Curr. Opin. Immunol.**, 2:246-8, 1989.
- CHATENOUD, L.; BAUDRIHAYE, M.F.; CHKOFF, N.; KREIS, H.; BACH, J.F. - Immunologic follow-up of renal allograft recipients treated prophylactically by OKT3 alone. **Transplant. Proc.**, 15:643-, 1983.

CHATENOUD, L.; THERVET, E.; PRIMO, J.; BACH, J.F. - Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91:123-7, 1994.

CHRISTIANSON, S.W.; SHULTZ, L.D.; LEITER, E.H. - Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-*Thy-1^a* donors. **Diabetes**, 42:44-55, 1993.

CISINI, A.B.; DELMONICO, F.L.; WRIGHT, J.K.; WEE, S.L.; PREFFER, F.I.; BEDEL, M.; CALVIN, R.B. - OKT4A monoclonal antibody immunosuppression of cynomolgus renal allograft recipients. **Transpl. Proc.**, 23:501-3, 1991.

COBBOLD, S.P.; JAYASURIYA, A.; NASH, A.; PROSPERO, T.D.; WALDMANN, H. - Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T cell subsets *in vivo*. **Nature**, 312:548-51, 1984.

COBBOLD, S.P.; QIN, S.; WALDMANN, H. - Reprogramming the immune system for tolerance with monoclonal antibodies. **Sem. in Immunol.**, 2:377-87, 1990.

CRISÁ, L.; SARKAR, P.; WAITE, D.J.; FRIEDRICH, F.H.; KOCH-NOLTE, F.; RAJAN, T.V.; MORDES, J.P.; HANDLER, E.S.; THIELE, H.-G.; ROSSINI, A.A.; GREINER, D.L. - An RT6^a gene is transcribed and translated in lymphopenic diabetes-prone BB rats. **Diabetes**, 42:688-95, 1993.

DARDENNE, M.; LEPAULT, F.; BENDELAC, A.; BACH, J.F. - Acceleration of the onset of diabetes in NOD mice by thymectomy at weaning. **Eur. J. Med.**, 19:889-95, 1989.

DAYAN, C.M.; LONDEI, M.; CORCORAN, A.E.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; JAMES, R.F.L.; RAPOPORT, B.; FELDMANN, M. - Autoantigen recognition by

- DAVIS, M.M. & BJORKMAN, P.J. - T-cell antigen receptor genes and T cell recognition. **Nature**, 334:395-402, 1988.
- DEBRAY-SACHS, M.; CARNAUD, C.; BOITARD, C.; COHEN, H.; GRESSER, I.; BEDOSSA, P.; BACH, J.F. - Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN γ . **J. Autoimm.**, 4:237-48, 1991.
- DeFRONZO, R.A. & FERRANNINI, E. - Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, 14:173-94, 1991.
- DIALYNAS, D.P.; WILDE, D.B.; MARRACK, P.; PIERRES, A.; WALL, K.A.; HAVRAN, W.; OTTEN, G; LOKEN, M.R.; PIERRES, M.; KAPPLER, J.; FITCH, F.W. - Characterization of the murine antigenic determinant, designed L3T4a, recogized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen reactivity. **Immunol. Rev.**, 74:29-56, 1983.
- DIAZ-GALLO, C.; MOSCOVITCH-LOPATIN, M.; STROM, T.B.; KELLEY, V.R. - An anergic, islet-infiltrating T-cell clone that suppresses murine diabetes secretes a factor that blocks interleukin 2/interleukin 4-dependent proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89:8656-60, 1992.
- DIB, S.A.; MECHICA, J.B.; RUSSO, E.M.K.; CHACRA, A.R.; CUDWORTH, A.G. - Anticorpos circulantes contra ilhotas pancreáticas, mucosa gástrica, tireóide e córtex adrenal em pacientes diabéticos brasileiros. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, 27:20, 1983. (Abstract)
- DURINOVIC-BELLÒ, I.; HUMMEL, M.; ZIEGLER, A.G. - Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. **Diabetes**, 45:795-800, 1996.

- EISENBARTH, G.S.; SRIKANTA, S.; JACKSON, R.; RABINOWE, S.; DOLINAR, R.; AOKI, T.; MORRIS, M.A. - Anti-thymocyte globulin and prednisone immunotherapy of recent onset type I diabetes mellitus. **Diabetes Res.**, 2:271-6, 1985.
- EIZIRIK, D.L.; MONTEIRO, C.M.C.; VOLTARELLI, J.C. ; FOSS, M.C. - Frequency of HLA antigens in a brazilian type I diabetic population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 20:533-7, 1987.
- EIZIRIK, D.L.; SANDLER, S.; PALMER, J.P. - Repair of pancreatic β cells. A relevant phenomenon in early IDDM? **Diabetes**, 42:1383-91, 1993.
- ELDER, M.E. & MACLAREN, N.K. - Identification of profound peripheral T lymphocyte immunodeficiencies in the spontaneously diabetic BB rat. **J. Immunol.**, 136:148-51, 1986.
- ELLIOT, R.B.; CROSSLEY, J.R.; BERRYMAN, C.C.; JAMES, A.G. - Partial preservation of pancreatic beta-cell function in children with diabetes. **Lancet**, 2:631-2, 1981.
- EMMRICH, J.; SEYFARTH, M.; FLEIG, W.E.; EMMRICH, F. - Treatment of inflammatory bowel disease with anti-CD4 monoclonal antibody. **Lancet**, 338:570-1,1991.
- FERRAN, C.; SHEEHAN, K.; DY, M.; SCHREIBER, R.; MERITE, S.; LANDAIS, P.; NOEL, L.H.; GRAU, G.; BLUESTONE, J. A.; BACH, J.F.; CHATENOU, L. - Cytokine-related syndrome following injection of anti-CD3 monoclonal antibody: further evidence for transient *in vivo* T cell activation. **Eur. J. Immunol.**, 20:509-15, 1990.

- FEUTREN, G.; PAPOZ, L.; ASSAN, R.; VIALLETES, B.; KARSENTY, G.; VEXIAU, P.; DU ROSTU, H.; RODIER, M.; SIRMAL, J.; LALLEMAND, A.; BACH, J.F. - Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin dependent diabetes of recent onset: results of a multicentre double-blind trial. **Lancet**, 2:119-24, 1986.
- FOWELL, D. & MASON, D. - Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. **J. Exp. Med.**, 177:627-36, 1993.
- GALFRE, G.; MILSTEIN, C.; WRIGHT, B. - Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. **Nature**, 277:131-3, 1979.
- GARCHON, H.J.; BEDOSSA, P.; ELOY, L.; BACH, J.F. - Identification and mapping to chromosome 1 of a susceptibility locus for periinsulitis in non-obese diabetic mice. **Nature**, 353:260-2, 1991.
- GEPTS, W. & DeMAY, J. - Islet cell survival determined by morphology. An immunocytochemical study of islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. **Diabetes**, 27(Suppl.):251-61, 1978.
- GHOSH, S.; PALMER, S.M.; RODRIGUES, N.R.; CORDELL, H.J.; HEARNE, C.M.; CORNALL, R.J.; PRINS, J.B.; McSHANE, P.; LATHROP, G.M.; PETERSON, L.B.; WICKER, L.S.; TODD, J.A. - Polygenic control of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **Nat. Genet.**, 4:404-9, 1993.
- GOMEZ DUMN, C.L.A.; SEMINO, M.C.; GAGLIARDINO, J.J. - Quantitative morphological changes in endocrine pancreas of rats with spontaneous diabetes mellitus. **Virchows Archiv B Cell Pathol**, 57:375-81, 1989.
- GOODNOW, C.C. - Cellular mechanisms of self-tolerance. **Curr. Opin. Immunol.**, 2:226-36, 1989.

- GORMAN, S.D.; CLARK, M.R.; ROUTLEDGE, E.G.; COBBOLD, S.P.; WALDMANN, H. - Reshaping a therapeutic CD4 antibody. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:4181-5, 1991.
- GORONZY, J.; WEYAND, C. M.; FATHMAN, C.G. - Long-term humoral unresponsiveness in vivo, induced by treatment with monoclonal antibody against L3T4. **J. Exp. Med.**, 164:911-25, 1986.
- GREINER, D.L.; HANDLER, E.S.; NAKANO, K.; MORDES, J.P.; ROSSINI, A.A. - Absence of the RT-6 T cell subset in diabetes-prone BB rat. **J. Immunol.**, 136:148-51, 1986.
- GREINER, D.L.; MORDES, J.P.; HANDLER, E.S.; ANGELILLO, M.; NAKAMURA, N.; ROSSINI, A.A. - Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats. **J. Exp. Med.**, 166:461-75, 1987.
- HAFLER, D.A.; RITZ, J.; SCHLOSSMAN, S.F.; WEINER, H.L. - Anti-CD4 and anti-CD2 monoclonal antibody infusion in subjects with multiple sclerosis. **J. Immunol.**, 141:131-8, 1988.
- HANDLER, E.S.; MORDES, J.P.; MICKEEVER, U.; NAKAMURA, N.; BERNHARD, J.; GREINER, D.L.; ROSSINI, A.A. - Effects of irradiation on diabetes in the BB/Wor rat. **Autoimmunity**, 4:21-30, 1989.
- HARADA, H. & MAKINO, S. - Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide. **Diabetologia**, 27:604-6, 1984.
- HARRISON, L.C.; CHU, S.X.; DeAIZPURUA, H.J.; GRAHAM, M.; HONEYMAN, M.C.; COLMAN, P.G. - Islet-reactive T cells are a marker of preclinical insulin-dependent diabetes. **J. Clin. Invest.**, 89:1161-5, 1992.

- HARRISON, L.C.; DeAIZPURUA, H.J.; LOUDOVARIS, T.; CAMPBELL, I.L.; CEBON, J.S.; TAIT, B.D.; COLMAN, P.G. - Reactivity to human islets and fetal pig proislets by peripheral blood mononuclear cells from subjects with preclinical and clinical insulin-dependent diabetes. **Diabetes**, 40:1128-33, 1991.
- HASKINS, K. & McDUFFIE, M. - Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. **Nature**, 249:1433-6, 1990.
- HATTORI, M.; BUSE, J.B.; JACKSON, R.A.; GLIMCHER, L.; DORF, M.E.; MINAMI, M.; MAKINO, S.; MORIWAKI, K.; KUZUYA, H.; IMURA, H.; STRAUSS, W.M.; SEIDMAN, J.G.; EISENBARTH, G.S. - The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. **Science**, 231:733-5, 1986.
- HELDERMAN, J.H.; PIETRI, A.O.; RASKIN, P. - In vitro control of T-lymphocyte insulin receptors by in vivo modulation of insulin. **Diabetes**, 32:712-7, 1983.
- HEROLD, K.C.; MONTAG, A.B.; FITCH, F.W. - Treatment with anti-T lymphocyte antibodies prevents induction of insulinitis in mice given multiple doses of streptozotocin. **Diabetes**, 36:796-801, 1987.
- HERZOG, C.; WALKER, C.; MUELLER, W.; RIEBER, P.; REITER, C.; RIETHMÜLLER, G.; WASSMER, P.; STOCKINGER, H.; MADIC, O.; PICHLER, W.J. - Anti-CD4 antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis. I. Effect on clinical course and circulating T cells. **J. Autoimmun.**, 2:627-42, 1989.
- HERZOG, C.; WALKER, C.; PICHLER, W.; AESCHLIMAN, A.; WASSMER, P. - Monoclonal anti-CD4 in arthritis. **Lancet**, 333:1461-2, 1987.
- HIDEKI, Y.; MITSUNOBU, M.; KIKUKO, K.; JUNKO, K.; SUSUMU, M.; MINORU, H. - Analysis of the role of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD using transfer to NOD athymic nude mice. **Eur. J. Immunol.**, 22:2387-93, 1992.

- HIEPE, F.; VOLK, H.D.; APOSTOLOFF, E.; von BAEHR, R.; EMMRICH, F. - Treatment of severe systemic lupus erythematosus with an anti-CD4 monoclonal antibody. *Lancet*, 338:1529-30, 1991.
- HONEYMAN, M.C.; CRAM, D.S.; HARRISON, L.C. - Glutamic acid decarboxylase 67-reactive T cells: a marker of insulin-dependent diabetes. *J. Exp. Med.*, 177:535-40, 1993.
- HUTCHINGS, P.; COOKE, A.; DAWE, K.; WALDMANN, H.; ROITT, I.M. - Active suppression induced by anti-CD4. *Eur. J. Immunol.*, 23:965-, 1993.
- HUTCHINGS, P.; O'REILLY, L.; PARISH, N.M.; WALDMANN, H.; COOKE, A. - The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to β cells in NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 22:1913-8, 1992.
- HUTCHINGS, P.; ROSEN, H.; O'REILLY, L.; SIMPSON, E.; GORDON, S.; COOKE, A. - Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. *Nature*, 348:639-42, 1990.
- JACKSON, R.; RASSI, N.; CRUMP, T.; HAYNES, B.; EISENBARTH, G.S. - The BB diabetic rat profound T-cell lymphocytopenia. *Diabetes*, 30:887-9, 1981.
- JANSEN, A.; HOMO-DELARCHE, F.; HOOLJKAAS, H.; LEENEN, P.J.; DARDENNE, M.; DREXHAGE, H.A. - Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and β -cell destruction in NOD mice. *Diabetes*, 43:667-75, 1994.
- KANO, Y.; KANATSUNA, T.; NAKAMURA, N.; KITAGAWA, Y.; MORI, H.; KAJIYAMA, S.; NAKANO, K.; KONDO, M. - Defect of the first-phase insulin secretion to glucose stimulation in the perfused pancreas of the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes*, 35:486-90, 1986.

- KARAM, J.H.; LEWITT, P.A.; YOUNG, C.W.; NOWLAIN, R.E.; FRANKEL, B.J.; FUJIYA, H.; FREEDMAN, Z.R.; GRODSKY, G.M. - Insulinopenic diabetes after rodenticide (Vacor) ingestion: a unique model of acquired diabetes in man. **Diabetes**, 29:971-8, 1980.
- KAWAMURA, T.; NAGATA, M.; UTSUGI, T.; YOON, J.W. - Prevention of autoimmune type I diabetes by CD4+ suppressor T cells in superantigen-treated non-obese diabetic mice. **J. Immunol.**, 151:4362-70, 1993.
- KAY, T.W.; CAMPBELL, I.L.; HARRISON, L.C. - Characterization of pancreatic T lymphocytes associated with beta cell destruction in the non-obese diabetic (NOD) mice. **J. Autoimmun.**, 4:263-76, 1991.
- KELLER, R.J. - Cellular immunity to human insulin in individuals at high risk for the development of type I diabetes mellitus. **J. Autoimmun.**, 3:321-7, 1990.
- KELLER, R.J.; JACKSON, R.A.; EISENBARTH, G.S. - Preservation of beta cell function in islet cell antibody (ICA) positive first degree relatives treated with insulin. **Diabetes**, 41 (Suppl.1):13A, 1992. (Abstract)
- KIESEL, U.; GREULICH, B.; MARXS-SOHO, M.; KOLB, H. - Induction of experimental autoimmune diabetes by low-dose streptozotocin treatment in genetically resistant mice. **Immunol. Lett.**, 3:227-30, 1981.
- KIKUTANI, H. & MAKINO, S. - The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Adv. Immunol.**, 51:285-322, 1992.
- KOCH, F.; HAAG, F.; KASHAM, A.; THIELE, H.G. - Primary structure of rat RT6.2, a nonglycosylated phosphatidylinositol-linked surface marker of postthymic T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87:964-7, 1990.

- KOCH, F.; HAAG, F.; THIELE, H.G. - Nucleotide and deduced amino acid sequence for the mouse homologue of the rat T-cell differentiation marker RT6. **Nucl. Acids Res.** 18:3636, 1990.
- KOEVARY, S.; ROSSINI, A.A.; STOLLER, W.; CHICK, W.; WILLIAMS, R.M. - Passive transfer of diabetes in the BB/W rat. **Science**, 220:727-8, 1983.
- KOEVARY, S.B.; WILLIAMS, D.E.; WILLIAMS, R.M.; CHICK, W.L. - Passive transfer of diabetes from BB/W to Wistar-Furth rats. **J. Clin. Invest.**, 75:1904-7, 1985.
- KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. - Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, 256:495-7, 1975.
- KOTZIN, B.L.; KARUTURI, S.; CHOU, Y.K.; LAFFERTY, J.; FORRESTER, M.; BETTER, M.; NEDWIN, G.E.; OFFNER, H.; VANDENBARK, A.A. - Preferential T-cell receptor β -chain variable gene use in myelin basic protein-reactive T-cell clones from patients with multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:9161-5, 1991.
- LANDO, Z.; TEITELBAUM, D.; ARNON, R. - Induction of experimental allergic encephalomyelitis in genetically resistant strains of mice. **Nature**, 287:551-2, 1980.
- LEITER, E.H.; SERREZE, D.V.; PROCHAZKA, M. - The genetics and epidemiology of diabetes in NOD mice. **Immunol. Today**, 11:147-51, 1990.
- LIKE, A.A.; GUBERSKI, D.L.; BUTLER, L. - Diabetic biobreeding/worcester (BB/Wor) rats need not be lymphopenic. **J. Immunol.**, 136:3254-8, 1986.
- LIKE, A.A.; KISLAUSKIS, E.; WILLIAMS, R.M.; ROSSINI, A.A. - Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. **Science**, 216:644-6, 1982.

- LO, D.; REILLY, C.R.; SCOTT, B.; LIBLAU, R.; McDEVITT, H.O.; BURKLY, L.C. - Antigen-presenting cells in adoptively transferred and spontaneous autoimmune diabetes. **Eur. J. Immunol.**, 23:1693-8, 1993.
- LUBAROFF, D.M.; RASMUSSEN, G.T.; HUNT, H.D. - The RT6 T cell antigen: its role in the identification of functional subsets and in T cell activation. **Transpl. Proc.**, 2:3251-4, 1989.
- LUND, T.; O'REILLY, L.; HUTCHING, P.; KANAGAWA, O.; SIMSON, E.; GRAVELY, R.; CHANDLER, P.; DYSON, J.; PICARD, J.K.; EDWARDS, A.; KIOUSSIS, D.; COOKE, A. - Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transgenes encoding modified I-A beta-chain or normal I-E alpha-chain. **Nature**, 345:727-9, 1990.
- MAKI, T.; ICHIKAWA, T.; BLANCO, R.; PORTER, J. - Long-term abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice by immunotherapy with anti-lymphocyte serum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89:3434-8, 1992.
- MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y. - Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Exp. Anim.**, 29:1-13, 1980.
- MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J.; THE BRAZILIAN COOPERATIVE GROUP ON THE STUDY OF DIABETES PREVALENCE. - Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, 15:1509-16, 1992.
- MANDRUP-POULSEN, T.; BENDTZEN, K.; NERUP, J.; DINARELO, C.A.; SVENSON, M.; NIELSEN, J.H. - Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. **Diabetologia**, 29:63-7, 1986.

- MATSUMOTO, M.; YAGI, H.; KUNIMOTO, K.; KAWAGUCHI, J.; MAKINO, S.; HARADA, M. - Transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to NOD athymic nude mice: the roles of T cell subsets in the pathogenesis. **Cell. Immunol.**, 148:189-97, 1993.
- MEGY, J.; GREINER, D.L.; LUBAROFF, D.M.; FITCH, F.W. - Characterization of monoclonal antibodies that define rat T cell alloantigens. **J. Immunol.**, 130:1798-801, 1983.
- MENDOLA, G.; CASAMITGANA, R.; GOMIS, R. - Effects of nicotinamide therapy upon β -cell function in newly diagnosed type I (insulin-dependent) diabetes mellitus patients. **Diabetologia**, 32:160-2, 1989.
- MÉTRO-DAYER, M.D.; MOULAND, A.; BRIDEAU, C.; DUHAMEL, D.; POUSSIER, P. - Adoptive transfer of diabetes in BB rats induced by CD4 T lymphocytes. **Diabetes**, 39:928-32, 1990.
- MILLER, B.J.; APPEL, M.C.; O'NEIL, J.J.; WICKER, L.S. - Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. **J. Immunol.**, 140:52-8, 1988.
- MITSUOKA, A.; BABA, M.; MORIKAWA, S. - Enhancement of delayed hypersensitivity by depletion of suppressor T cell with cyclophosphamide in mice. **Nature**, 262:77-8, 1976.
- MITSUOKA, A.; MORIKAWA, S.; BABA, M.; HARADA, T. - Cyclophosphamide eliminates suppressor T cells in age-associated central regulation of delayed hypersensitivity in mice. **J. Exp. Med.**, 149:1018-28, 1979.
- MIYASAKI, A.; HANAFUSA, T.; YAMADA, K.; MIYAGAWA, J.; FUJINO-KURIHARA, H.; NAKAJIMA, H.; NONAKA, K.; TARUI, S. - Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. **Clin. Exp. Immunol.**, 60:622-30, 1985.

- MIYASAKI, T.; UNO, M.; UECHIRA, M.; KIKYTANI, H.; KISHIMOTO, T.; KIMOTO, M.; NISHIMOTO, H.; MIYASAKI, J.; YAMAMURA, K. - Direct evidence for the contribution of the unique I-A^{nod} to the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. **Nature**, 345:722-4, 1990.
- MOJCIK, C.F.; GREINER, D.L.; MEDLOCK, E.S.; KOMSCHLIES, K.L.; GOLDSCHNEIDER, I. - Characterization of RT6 bearing rat lymphocytes. **Cell. Immunol.**, 114:336-46, 1988.
- NAGATA, M.; SANTAMARIA, P.; KAWAMURA, T.; UTSUGI, T.; YOON, J.W. - Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic β -cells in nonobese diabetic mice. **J. Immunol.**, 152:2042-50, 1994.
- NAGATA, M. & YOON, J.W. - Studies on autoimmunity for T-cell-mediated β -cell destruction. Distinct difference in β -cell destruction between CD4+ and CD8+ T-cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice. **Diabetes**, 41:998-1008, 1992.
- NAKANO, N.; KIKUTANI, H.; NISHIMOTO, H.; KISHIMOTO, T. - T cell receptor V gene usage of islet β cell-reactive T cells is not restricted in non-obese diabetic mice. **J. Exp. Med.**, 173:1091-7, 1991.
- NAKHOODA, A.F.; LIKE, A.A.; CHAPPEL, C.I.; MURRAY, F.T.; MARLISS, E.B. - The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. **Diabetes**, 26:100-12, 1977.
- NATIONAL DIABETES DATA GROUP - Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**, 28:1039-57, 1979.
- NEPOM, G.T. & ERLICH, H. - MHC class-II molecules and autoimmunity. **Annu. Rev. Immunol.**, 9:493-526, 1991.

- NICOLAS, J.F.; CHAMCHICK, N.; THIVOLET, J.; WIJDENES, J.; MOREL, P.; REVILLARD, J.P. - CD4 antibody treatment of severe psoriasis. **Lancet**, 338:321, 1991.
- NISHIMOTO, H.; KIKUTANI, H.; YAMAMURA, K.; KISHIMOTO, T. - Prevention of autoimmune insulinitis by expression of I-E molecules in NOD mice. **Nature**, 328:432-4, 1987.
- OGAWA, M.; MARUYAMA, T.; HASEGAWA, T.; KANAYA, T.; KOBAYASHI, F.; TOCHINO, Y.; UDA H. - The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mice. **Biomed. Res.**, 6:103-5, 1985.
- OLIVEIRA, K.S.; PINHEIRO, M.F.M.C.; MIRANDA, W.L.; DIB, S.A.; RUSSO, E.M.K. - Associação entre auto-anticorpos anti-pró-insulina e insulina com diabetes mellittus do tipo I. **Arq. Bras. Endocrinol.**, 37:120-4, 1993.
- O'REILLY, L.A.; HUTCHINGS, P.R.; CROCKER, P.R.; SIMPSON, E.; LUND, T.; KIOUSSIS, D.; TAKEI, F.; BAIRD, J.; COOKE, A. - Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. **Eur. J. Immunol.**, 21:1171-80, 1991.
- PANKEWYCZ, O.; STROM, T.B.; RUBIN-KELLEY, V.E. - Islet-infiltrating T cell clones from non-obese diabetic mice that promote or prevent accelerated onset diabetes. **Eur. J. Immunol.**, 21:873-9, 1991.
- PARISH, N.M.; HUTCHINGS, P.R.; WALDMANN, H.; COOKE, A. - Tolerance to IDDM induced by CD4 antibodies in nonobese diabetic mice is reversed by cyclophosphamide. **Diabetes**, 42:1601-5, 1993.

- PAVIN, E.J. & ZOLLNER, R.L. - 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 auto-imunes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 38:105-8, 1994.
- PAYTON, M.A.; HAWKES, G.J.; CHRISTIE, M.R. - Relationship of the 37,000 and 40,000 MR tryptic fragments of islet antigens in IDDM to the protein tyrosine phosphatase like molecule IA-2 (ICA512). **J. Clin. Invest.**, 96:1506-11, 1995.
- POCIOT, F.; RONNINGEN, K.; BERGHOLDT, R.; LORENZEN, T.; JOHANNESSEN, J.; YE, K.; DINARELLO, C.A.; NERUP, J. AND THE DANISH STUDY GROUP OF DIABETES IN CHILDHOOD. - Genetic susceptibility markers in danish patients with type I (insulin-dependent) diabetes - evidence for polygenecity in man. **Autoimmunity**, 19:169-78, 1994.
- POZZILLI, P.; SIGNORE, A.; WILLIAMS, A.J.K.; BEALES, P.E. - NOD mouse colonies around the world - recent facts and figures. **Immunol. Today**, 14:193-6, 1993.
- PROCHAZKA, M.; GASKINS, H.G.; LEITER, E.H.; KOCH-NOLTE, F.; HAAG, F.; THIELE, H. - Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6. **Immunogenetics**, 33:152-6, 1991.
- QIN, S.; COBBOLD, S.; BENJAMIN, R.; WALDMANN, H. - Induction of classical transplantation tolerance in the adult. **J. Exp. Med.**, 169:779-94, 1989.
- QIN, S.; COBBOLD, S.; TIGHE, H.; BENJAMIN, R.; WALDMANN, H. - CD4 monoclonal antibody pars for immunosuppression and tolerance induction. **Eur. J. Immunol.**, 17:1159-65, 1987.

- QIN, H.Y.; SADELAIN, M.W.J.; HITCHON, C.; LAUZON, J.; SINGH, B. - Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. **J. Immunol.**, 150:2072-80, 1993.
- RABIN, D.U.; PLEASIC, S.M.; SHAPIRO, J.A.; YOO-WAREN, H.; HICKS, J.M.; GOLDSTEIN, D.E.; REA, P.M.M. - Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. **J. Immunol.**, 152:3183-8, 1994.
- RANGES, G.E.; SRIRAM, S.; COOPER, S.M. - Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. **J. Exp. Med.**, 162:1105-10, 1985.
- REICH, E.P.; SHERWIN, R.S.; KANAGAWA, O.; JANEWAY, C.A.Jr. - An explanation for the protective effect of the MHC class II I-E molecule in murine diabetes. **Nature**, 341:326-9, 1989.
- REITER, C.; KAKAVAND, B.; RIEBER, E.P.; SCHATTENKIRCHNER, M.; RIETHMÜLLER, G.; KRÜGER, K. - Treatment of rheumatoid arthritis with monoclonal CD4 antibody M-T151. Clinical results and immunopharmacologic effects in an open study, including repeated administration. **Arthritis & Rheumatism.**, 34:525-36, 1991.
- RETH, M.; HOMBACH, J.; WIENANDS, J.; CAMPBELL, K.S.; CHIEN, N.; JUSTEMENT, L.B.; CAMBIER, J.C. - The B-cell antigen receptor complex. **Imunol. Today**, 12: 196-201, 1991.
- RIECHMAN, L.; CLARK, M.; WALDMANN, H.; WINTER G. - Reshaping human antibodies for therapy. **Nature**, 332:323-7, 1988.
- ROBINSON, P.J. - Phosphatidylinositol anchors and T cell activation. **Immunol. Today**, 12:35-41, 1991.

- ROEP, B.O.; KALLAN, A.A.; HAZENBOS, W.L.W.; BRUINING, G.L.; BAILYES, E.M.; ARDEN, S.D.; HUTTON, J.C.; de VRIES, R.R.P. - T-cell reactivity to 38 kD insulin-secretory-granule protein in patients with recent-onset type I diabetes. **Lancet**, 337:1439-41, 1991.
- ROSE, N.R. & BONA, C. - Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revised). **Immunol. Today**, 14:426-30, 1993.
- ROSSINI, A.A.; GREINER, D.L.; FRIEDMAN, H.P.; MORDES, J.P. - Immunopathogenesis of diabetes mellitus. **Diabetes Rev.**, 1:43-75, 1993.
- ROSSINI, A.A.; MORDES, J.P.; GREINER, D.L.; WAKANO, K.; APPEL, M.C.; HANDLER, E. - Spleen cell transfusion in the BB/W rat: prevention of diabetes, MHC restriction, and long term persistence of transfused cells. **J. Clin. Invest.**, 77:1399-401, 1986.
- SCHREIBER, S.L. & CRABTREE, G.R. - The mechanisms of action of cyclosporin A and FK506. **Immunol. Today**, 13:136-42, 1992.
- SCHWARTZ, R.H. - Immunological Tolerance. In: PAUL, W.E. - **Fundamental Immunology**. New York, Raven Press Ltd., 1993. p.677-731.
- SCULLY, R.; QIN, S.; COBBOLD, S.; WALDMANN, H. - Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. **Eur. J. Immunol.**, 24:2383-92, 1994.
- SEEMAYER, T.A.; TANNENBAUM, G.S.; GOLDMAN, H.; COLLE, E. - Dynamic time course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. **Am. J. Pathol.**, 106:237-49, 1982.

- SEMPÉ, P.; BÉDOSSA, P.; RICHARD, M.F.; VILLÀ, M.C.; BACH, J.F.; BOITARD, C.
- Anti- α/β T cell receptor monoclonal antibody provides an efficient therapy for autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. **Eur. J. Immunol.**, 21:1163-9, 1991.
- SHAH, C.S.; MALONE, J.I; SIMPSON, N.E. - A randomized trial of intensive insulin therapy in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, 320:550-4, 1989.
- SHIZURU, J.A.; TAYLOR-EDWARDS, C.; BANKS, B.A.; GREGORY, A.K.; FATHMAN, C.G. - Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to t-helper lymphocytes. **Science**, 240:659-62, 1988.
- SIGNORE, A.; POZZILLI, P.; GALE, E.A.M.; ANDREANI, D.; BEVERLEY, P.C.L. - The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. **Diabetologia**, 32:282-9, 1989.
- SILVERSTEIN, J.; MACLAREN, N; RILEY, W.; SPILLAR, R.; RADJENOVIC, D.; JOHNSON, S. - Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, 319:599-604, 1988.
- SKYLER, J.S. & MARKS, J.B. - Immune intervention in type I diabetes mellitus. **Diabetes Rev.**, 1:15-42, 1993.
- SOMOZA, N.; VARGAS, F.; ROURA-MIR, C.; VIVES-PI, M.; FERNANDÉZ-FIGUEIRAS, M.T.; ARIZA, A.; GOMIZ, R.; BRAGADO, R.; MARTÍ, M.; JARAQUEMADA, D.; PUJOL-BORRELL, R. - Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V β usage, and cytokine profile. **J. Immunol.**, 153:1360-77, 1994.

- STRANDELL, E.; EIZIRIK, D.L.; SANDLER, S. - Reversal of β -cell suppression in vitro in pancreatic islets isolated from nonobese diabetic mice during the phase preceding insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.** 85:1944-50, 1990.
- TAKI, T.; NAGATA, M.; OGAWA, W.; HATAMORI, N.; HAYAKAWA, M.; HARI, J.; SHII, K.; BABA, S.; YOKONO, K. - Prevention of cyclophosphamide-induced and spontaneous diabetes in NOD/Shi/Kbe mice by anti-MHC class I K^d monoclonal antibody. **Diabetes**, 40:1203-9, 1991.
- THE CANADIAN-EUROPEAN RANDOMIZED CONTROL TRIAL GROUP. - Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention: association of 1 year of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. **Diabetes**, 37:1574-82, 1988.
- THIELE, H.G.; KOCH, F.; HAMANN, A.; ARNDT, R. - Biochemical characterization of the T-cell alloantigen RT-6.2. **Immunol.**, 59:195-201, 1986.
- THIELE, H.G.; KOCH, F.; KASHAM, A. - Post natal distribution profiles of Thy-1+ and RT6+ cells in peripheral lymph nodes of DA-rats. **Transpl. Proc.**, 19:3157-60, 1987.
- THIVOLET, C.; BENDELAC, A.; BEDOSSA, P.; BACH, J.F.; CARNAUD, C. - CD8+ T cell homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is CD4+ T cell-dependent. **J. Immunol.**, 146:85-8, 1991.
- TODD, J.A.; AITMAN, T.J.; CORNALL, R.J.; GHOSH, S.; HALL, J.R.; HEARNE, C.M.; KNIGHT, A.M.; LOVE, J.M.; McALEER, M.A.; PRINS, J.B.; RODRIGUES, N.; LATHROP, M.; PRESSEY, A.; DELARATO, N.H.; PETERSON, L.B.; WICKER, L.S. - Genetic analysis of autoimmune type I diabetes mellitus in mice. **Nature**, 351:542-7, 1991.
- TURK, J.L. & PARKER, D. - Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. **Immunol. Rev.**, 65:99-113, 1982.

- VAGUE, P.; VIALLETES, B.; LASSMAN-VAGUE, V.; VALLO, J.J. - Nicotinamide may extend remission phase in insulin dependent diabetes. **Lancet**, 1:619-20, 1987.
- VOLPINI, W.M. & TAMBASCIA, M.A. - Mecanismos gerais de tolerância imunológica e auto-imunidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 40:14-22, 1996a.
- VOLPINI, W.M. & TAMBASCIA, M.A. - Diabetes melito auto-imune: história natural de uma síndrome auto-imune. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 1996b. [No prelo]
- WALDOR, M.; SRIRAM, K.S.; HARDY, R.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.; LANIER, L.; LIM, M.; STEINMAN, L. - Reversal of experimental allergic encephalomyelitis with a monoclonal antibody to a T cell subset marker (L3T4). **Science**, 227:415-7, 1985.
- WANG, Y.; PONTESILLI, O.; GILL, R.G.; La ROSA, F.G.; LAFFERTY, K.J. - The role of CD4+ and CD8+ T cells in the destruction of islets grafts by spontaneously diabetic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:527-31, 1991.
- WICKER, L.S.; MILLER, B.J.; MULLEN, Y. - Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. **Diabetes**, 35:855-60, 1986.
- WOFSY, D.W. & SEAMAN, W.E. - Reversal of advanced murine lupus in NZB/NZW F1 mice by treatment with monoclonal antibody to L3T4. **J. Immunol.**, 138:3247-53, 1987.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second Report. Geneva, World Health Org. **Tech. Rep. Ser.**, nº 646:8-12, 1980.
- YALE, J.F. & MARLISS, E.B. - Altered immunity and diabetes in the BB rat. **Endocrinology**, 110:1825-7, 1982.
- YASUNAMI, R. & BACH, J.F. - Anti-supressor effect of cyclophosphamide on the development of spontaneous diabetes in NOD mice. **Eur. J. Immunol.**, 18:481-4, 1988.

- XIANGPING, L.; GOLDEN, J.; FAUSTMAN, D. - Faulty major histocompatibility complex class II I-E expression is associated with autoimmunity in diverse strains of mice. **Diabetes**, 42:1166-72, 1993.
- ZHANG, Z.L.; GEORGIU, H.M.; MANDEL, T.E. - The effect of cyclophosphamide treatment on lymphocyte subsets in the nonobese diabetic mouse: a comparison of various lymphoid organs. **Autoimmunity**, 15:1-10, 1993.
- ZIMMET, P.Z.; TUOMI, T.; MACKAY, I.R.; ROWLEY, M.J.; KNOWLES, W.J.; COHEN, M.; LANG, D.A. - Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA) - the role of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. **Diabetic Med**, 11:299-303, 1994.
- ZIMMET, P.Z. - The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. Genes, autoimmunity, and demography. **Diabetes Care**, 18:1-15, 1995.